



**Sofia Isabel Almeida
Pereira**

**Efeitos da toxicidade por metais pesados em
Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii***

**Diversidade e resposta de populações isoladas de
uma mina de chumbo**



**Sofia Isabel Almeida
Pereira**

**Efeitos da toxicidade por metais pesados em
Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii***

**Diversidade e resposta de populações isoladas de
uma mina de chumbo**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biologia, realizada sob a orientação científica do Professora Doutora Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e da Doutora Isabel Maria da Silva Videira e Castro Viana, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Recursos Biológicos.

Apoio financeiro da FCT e do FSE no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio (Bolsa de Doutoramento SFRH/BD/18843/2004).

o júri

Presidente

Prof. Doutor Joaquim José Borges Gouveia
Professor Catedrático do Departamento de Economia, Gestão e Engenharia Industrial da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Ana Dias Monteiro Santos
Professora Catedrática do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Emília Lima Costa
Professora Associada da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve

Prof. Doutora Etelvina Maria de Almeida Paula Figueira
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Cristina Maria Nobre Sobral de Vilhena da Cruz Houghton
Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Prof. Doutora Isabel Maria Videira e Castro Viana
Investigadora Auxiliar do Laboratório Nacional de Investigação Agrária do Instituto Nacional de Recursos Biológicos

Prof. Doutora Paula Alexandra Ramos Vicente de Sá Pereira
Investigadora Auxiliar do Laboratório Nacional de Investigação Agrária do Instituto Nacional de Recursos Biológicos

agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os que contribuíram e me incentivaram durante a realização desta tese. Quero no entanto salientar a minha profunda gratidão:

À Doutora Etelvina Maria Almeida Paula Figueira, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, orientadora desta tese pela ajuda científica prestada e pela amizade demonstrada ao longo destes anos.

À Doutora Isabel Videira e Castro, Investigadora Auxiliar do Instituto Biológico de Recursos Naturais, co-orientadora desta tese pela ajuda científica e por me ter recebido tão bem no seu laboratório.

Ao Eng. Eugénio Ferreira por me ter recebido no seu laboratório.

À Doutora Fernanda Simões do INETI pela ajuda na interpretação dos resultados da sequenciação.

Ao Professor Doutor Vítor Quintino pela disponibilização da torre de crivos e à Rosa Freitas pela ajuda no tratamento dos resultados da granulometria.

À Elisabeth Costa pela ajuda no trabalho prático.

À Ana Lima pela amizade demonstrada ao longo destes anos e pelas palavras amigas nas horas mais difíceis.

À Rita Castro pela paciência e amizade demonstrada e por todas as conversas ao longo destes anos que me incentivaram e fizeram com que acreditasse que iria chegar ao fim.

À Sofia Corticeiro pela grande ajuda na componente prática deste trabalho, pela partilha dos momentos mais difíceis na execução desta tese e acima de tudo pela amizade e companheirismo demonstrado.

Ao Centro de Biologia Celular da Universidade de Aveiro pela utilização do equipamento.

Ao meu pai pelo carinho e amor e pelos conselhos nos meus momentos de indecisão e de quebra. És e sempre serás o meu porto de abrigo.

À minha mãe pela atenção e carinho que sempre demonstrou.

Ao Luís pelo carinho e amor ao longo de tantos anos e também pela compreensão e grande incentivo nas horas mais difíceis da minha vida.

A todos os meus amigos em especial à Anabela, à Ana Lúcia, à Marta, à Cristina Reina, ao Hugo, ao Alberto e ao Miguel pelo encorajamento que sempre me deram ao longo de todos estes anos e pelo apoio nos momentos mais difíceis da minha vida.

palavras-chave

Rhizobium, metais pesados, fixação azoto, diversidade

resumo

Nas últimas décadas verificou-se um aumento da contaminação dos solos com metais pesados resultante de processos antropogénicos. As descargas de efluentes industriais, a actividade mineira e a aplicação de lamas residuais e de fertilizantes são as principais fontes de metais pesados. Em certas regiões, a acumulação destes elementos nos solos tem atingido níveis preocupantes para o equilíbrio dos ecossistemas. Vários estudos têm demonstrado que os metais influenciam os microrganismos afectando adversamente o seu crescimento, morfologia e actividades bioquímicas resultando num decréscimo da biomassa e diversidade. Entre os microrganismos do solo, as bactérias pertencentes ao género *Rhizobium* têm um elevado interesse científico, económico e ecológico devido à sua capacidade para fixar azoto. Deste modo, o trabalho desenvolvido ao longo desta tese incidiu sobre o efeito da toxicidade imposta pelos metais nas bactérias fixadoras de azoto, em particular em *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* e teve como principais objectivos: determinar o efeito dos metais pesados na sobrevivência e na capacidade de fixar azoto dos isolados de rizóbio; avaliar a influência dos metais na diversidade das populações de rizóbio isoladas de solos contaminados; determinar os níveis de tolerância do rizóbio a diferentes metais e analisar a resposta ao stresse oxidativo imposto pelo cádmio. A Mina do Braçal foi o local de estudo escolhido uma vez que os seus solos estão muito contaminados com metais em resultado da extracção de minério durante mais de 100 anos. Foram escolhidos 3 solos com diferentes graus de contaminação, o solo BC com concentrações reduzidas de metais, escolhido por estar numa zona já fora da mina e designado por solo controlo e os solos BD e BA considerados medianamente e muito contaminados, respectivamente. O Pb e o Cd foram os metais predominantes nestes solos, assim como o metalóide As, cujas concentrações ultrapassaram largamente os limites previstos na lei. Sendo as enzimas do solo boas indicadoras da qualidade do mesmo, foi determinada a actividade de algumas como a desidrogenase (DHA) e a catalase (CAT). Ambas as enzimas correlacionaram-se negativamente com as concentrações de metais nos solos. A dimensão das populações indígenas de rizóbio nos solos contaminados (BD e BA) foi bastante baixa, 9,1 bactérias g⁻¹ de solo e 7,3 bactérias g⁻¹ de solo, respectivamente, quando em comparação com a população do solo BC (4,24x10⁴ bactérias g⁻¹ de solo). Estes resultados parecem estar relacionados com o elevado conteúdo em metais e com o pH ácido dos solos. A capacidade simbiótica também foi afectada pela presença de metais, uma vez que os isolados originários do solo BD mostraram menor capacidade em fixar azoto do que os isolados do solo controlo. A diversidade das populações de rizóbio foi determinada com recurso à análise dos perfis de plasmídeos, perfis de REP e ERIC-PCR de DNA genómico e perfis de proteínas e lipopolissacarídeos.

No conjunto dos 35 isolados analisados foram identificados 11 plasmídeos com pesos moleculares entre 669 kb e 56 kb. Embora a incidência de plasmídeos tenha sido superior nos isolados do solo BC verificou-se maior diversidade plasmídica na população isolada do solo BD. Resultados similares foram obtidos com os perfis de REP e ERIC-PCR e perfis de proteínas, que indicaram maior diversidade nas populações dos solos contaminados (BD e BA), contrariamente ao verificado por outros autores. O grau de tolerância aos metais pesados e ao arsénio dos vários isolados testados dependeu do metal e do local de origem. No geral, os isolados do solo BD mostraram maior tolerância aos metais do que os isolados do solo controle, o que está de acordo com o esperado uma vez que geralmente as populações dos locais contaminados são mais tolerantes. Contudo, os isolados do local mais contaminado (BA) foram muito tolerantes apenas ao chumbo mostrando-se sensíveis aos restantes metais. A inoculação dos solos BC, BD e BA após irradiação com estirpes seleccionadas de rizóbio permitiu avaliar a sua sobrevivência ao longo de 12 meses em condições mais realistas. Verificou-se que após um decréscimo inicial, os isolados inoculados no solo BC conseguiram recuperar a dimensão das suas populações para números similares aos inicialmente introduzidos, contrariamente ao verificado no solo BD onde o número de rizóbios decresceu ao longo dos 12 meses. As condições adversas do solo BA apenas permitiram a sobrevivência de 4 isolados até aos 3 meses e apenas dois deles conseguiram sobreviver após 12 meses, designadamente C 3-1 e A 17-3. Estes isolados possuem um plasmídeo de 669 kb que poderá estar na base da sobrevivência destas estirpes. Por outro lado, o último isolado é originário do solo contaminado e por isso estará também mais adaptado a sobreviver às elevadas concentrações de Pb existentes no solo BA. Por fim, constatou-se que o cádmio, um dos metais presente em concentrações mais elevadas nos solos em estudo, é um indutor de stresse oxidativo nos isolados de rizóbio menos tolerantes o que foi confirmado pelo aumento de ROS e danos celulares ao nível dos lípidos.

keywords

Rhizobium, heavy metals, nitrogen fixation, diversity

abstract

In the last decades, an increased in soil metal contamination, resulting from anthropogenic processes has been observed. Industrial effluent discharges, mining activities and the applications of industrial sludge and fertilizers are the main sources of heavy metal contamination. In some regions, the build-up of these elements has been reaching disturbing levels that may threaten the ecosystem's equilibrium. Several studies showed that metals can influence microorganisms, adversely affecting their growth, morphology and biochemical activities, hence resulting in a decrease in biomass and diversity. Among soil microorganisms, bacteria from the genus *Rhizobium* have a high scientific, economical and ecological interest, due to their ability to fix nitrogen. Under this context, the work developed throughout this thesis focused on the effects of metal toxicity on nitrogen fixation bacteria, particularly in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and had the following goals: to determine the effect of heavy metals on the survival and nitrogen fixing abilities of rhizobia, evaluate the influence of heavy metals in the diversity of *Rhizobium* populations isolated from contaminated soils, to determine the levels of tolerance to different metals and to analyze the response to the oxidative stress imposed by cadmium. Braçal mine was the chosen study location, since their soils are very contaminated with metals as a result of the mining extractions undertaken during over 100 years. Three soils with different degrees of contamination were chosen, BC soil, with reduced metal contamination, collected from the periphery of the mine and considered the control soil and BD and BA soils, with median and high metal contamination, respectively. Pb and Cd were the predominant metals in these soils, as well as the metalloid As, that presented concentrations high above the limits predicted by law. Since soil enzymes are good indicators of soil quality, the activity of some enzymes such as deshydrogenase (DHA) and catalase (CAT) were studied. Both enzymes were negatively correlated with soil metal concentrations. The dimension of *Rhizobium* indigenous populations in the contaminated soils (BD and BA) was very low, 9.1 bacteria g⁻¹ soil and 7.3 bacteria g⁻¹ soil, respectively, in comparison to BC soil (4.24x10⁴ bacteria g⁻¹ soil). These results seem to be related to the high metal content and the acid pH of soils. The symbiotic ability was also affected by metal contamination, since the isolates from BD soils showed a lower ability to fix nitrogen when compared to controls. The diversity of *Rhizobium* populations was determined with plasmid profile analysis, REP and ERIC-PCR from genomic DNA and protein and lipopolysaccharide profiles. From the 35 analyzed isolates, 11 plasmids were identified, with molecular weights ranging from 669 and 56 kb. Although plasmid incidence was higher on BC soils isolates, higher plasmid diversity was observed in BD isolates.

Similar results were obtained with REP and ERIC-PCR and protein profiles which indicated a higher diversity of populations isolated from the contaminated soils (BD and BA), which was contrary to results observed by other authors. Isolate metal tolerance levels was dependent on the metal and strain origin. Generally, isolates from BD soils showed higher metal tolerance than control isolates, as was expected, since populations from contaminated soils usually present higher tolerance. Nonetheless, the isolates from the most contaminated soil (BA) presented higher tolerance to Pb but high sensitivity to the other metals. The inoculation of soils BC, BD and BA after irradiation, with selected *Rhizobium* strains allowed us to evaluate their survival throughout 12 months in more realistic conditions. It was observed that after an initial decrease, isolates from BC soils were able to recover the size of their populations the initial population sizes, unlike BD soils, where the number of *Rhizobium* cells decreased throughout the 12 months. The adverse conditions in BA soils only allowed the survival of 4 isolates up to 3 months and only two were able to survive the 12 months (C 3-1 and A 17-3). These isolates presented a 669 kb plasmid that could be the basis of these strain's survival. Moreover, the strain A17-3 was isolated from the contaminated soil and for this reason could be more adapted and survive to high concentrations of Pb presented in BA soil. Finally, it was observed that cadmium, one of the metals presented in higher concentrations in soils, is an inducer of oxidative stress in the less tolerant *Rhizobium* isolates, which was confirmed by ROS increase and lipid cellular damage.

Índice

Índice	viii
Lista de Tabelas	xvi
Lista de Figuras	xviii
Abreviaturas	xxiv

Capítulo 1

Introdução Geral	1
1.1 Contaminação dos solos por metais pesados	1
1.1.1 Fontes de contaminação por metais pesados	3
1.1.2 Biodisponibilidade dos metais pesados	5
1.2 Influência dos metais pesados na qualidade do solo	6
1.3 Efeitos dos metais pesados nos microrganismos do solo	8
1.3.1 Efeitos dos metais pesados no rizóbio e na fixação de azoto	9
1.4 Simbiose <i>Rhizobium</i> -leguminosa	10
1.4.1 Processo de infecção e nodulação das raízes pelo rizóbio	12
1.4.2 Genes que controlam a nodulação	13
1.4.3 Fixação de azoto	14
1.5 Diversidade microbiana	15
1.6 Respostas dos microrganismos aos metais pesados	17
1.6.1 Indução do sistema antioxidante	17
1.6.2 Mecanismos de resistência/tolerância	17
1.7 Objectivos gerais	20

Capítulo 2

Caracterização do local de amostragem e influência dos metais pesados nas enzimas do solo	21
2.1 Introdução	21
2.2 Material e Métodos	25
2.2.1 Caracterização do local de amostragem	25
2.2.1.1 Descrição do local	25

2.2.1.2 Colheita das amostras de solos	26
2.2.1.3 Características físico-químicas dos solos	26
2.2.2 Determinação da actividade de enzimas do solo	28
2.2.2.1 Hidrólise do diacetato de fluorescina (HFDA)	28
2.2.2.2 Actividade da Desidrogenase (DHA)	29
2.2.2.3 Actividade da Catalase (CAT)	29
2.2.2.4 Actividade das fosfatases ácida e alcalina (FAC/FAL)	29
2.2.2.5 Actividade da Lipase (LIP)	30
2.2.3 Análise estatística	30
2.3 Resultados	31
2.3.1 Parâmetros físico-químicos dos solos	31
2.3.2 Concentração de metais pesados e do metalóide arsénio nos solos	34
2.3.3 Enzimas dos solos	35
2.4 Discussão	40
2.4.1 Características físico-químicas dos solos	40
2.4.2 Influência da contaminação por metais pesados na actividade enzimática do solo	43
 Capítulo 3	
Isolamento, caracterização e determinação da capacidade simbiótica de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	49
3.1 Introdução	49
3.2 Material e Métodos	54
3.2.1 Meios de cultura	54
3.2.2 Determinação da população de <i>Rhizobium</i> pelo método do número mais provável (NMP)	56
3.2.3 Isolamento e caracterização morfológica de <i>Rhizobium</i>	56
3.2.3.1 Conservação das culturas	57
3.2.4 Autenticidade dos isolados de <i>Rhizobium</i>	57
3.2.5 Gene <i>nodC</i>	58
3.2.5.1 Preparação das amostras	58

3.2.5.2 Extracção do DNA bacteriano total	58
3.2.5.3 <i>nodC</i> -PCR	59
3.2.6 Identificação dos isolados por 16S rDNA	59
3.2.6.1 Preparação das amostras	60
3.2.6.2 Extracção do DNA bacteriano total	60
3.2.6.3 16S rDNA – PCR	60
3.2.6.4 Sequenciação	60
3.2.7 Capacidade simbiótica	61
3.2.7.1 Determinação do peso seco das plantas de trevo	60
3.2.8 Produção de substâncias promotoras de crescimento	61
3.2.8.1 Ácido indol acético (IAA)	61
3.2.8.2 Produção de sideróforos	62
3.2.8.3 Capacidade de solubilizar fosfato inorgânico	62
3.2.9 Análise estatística	62
3.3 Resultados	63
3.3.1 Determinação da população de <i>Rhizobium</i> indígena dos solos	63
3.3.2 Isolamento de <i>Rhizobium</i> de nódulos radiculares de trevo branco	63
3.3.3 Autenticidade dos isolados	65
3.3.4. Identificação de isolados de <i>Rhizobium</i> por 16S rDNA-PCR	67
3.3.5 Avaliação da capacidade simbiótica dos isolados de <i>Rhizobium</i>	69
3.3.6 Produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal	71
3.3.6.1 Produção de Ácido indol acético (IAA)	71
3.3.6.2 Produção de sideróforos	73
3.3.6.3 Solubilização do fosfato inorgânico	74
3.4 Discussão	75
3.4.1 Influência dos factores ambientais na sobrevivência do rizóbio	75
3.4.2 Isolamento do rizóbio e autenticidade	76
3.4.3 Capacidade simbiótica	79
3.4.4 Substâncias promotoras do crescimento vegetal (SPCV)	80

Capítulo 4

Diversidade da população natural de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	83
4.1 Introdução	83
4.2 Material e Métodos	87
4.2.1 Material Biológico	87
4.2.2 Análise de DNA-plasmídico	87
4.2.2.1 Preparação das amostras	87
4.2.2.2 Electroforese	88
4.2.2.4 Estimativa dos pesos moleculares	88
4.2.3 REP-PCR e ERIC-PCR	88
4.2.3.1 Preparação das amostras	89
4.2.3.2 Extracção do DNA bacteriano total	89
4.2.3.3 REP-PCR	89
4.2.3.4 ERIC-PCR	90
4.2.3.4 Tratamento dos resultados	90
4.2.4 Proteínas totais	91
4.2.4.1 Preparação das amostras	91
4.2.4.2 Electroforese	91
4.2.4.3 Coloração	91
4.2.4.5 Tratamento dos resultados	92
4.2.5 Lipopolissacarídeos (LPS)	92
4.2.5.1 Preparação das amostras	92
4.2.5.2 Electroforese	93
4.2.5.3 Coloração	93
4.2.5.4 Tratamento dos resultados	93
4.3 Resultados	94
4.3.1 Análise dos perfis plasmídicos dos isolados	94
4.3.2 REP-PCR	99
4.3.3 ERIC-PCR	101

4.3.4 Perfis proteínas totais	105
4.3.5 Perfis de lipopolissacarídeos (LPS)	108
4.4 Discussão	111
4.4.1 Perfis de plasmídeos	111
4.4.2 Análise dos perfis de REP-PCR e ERIC-PCR	113
4.4.3 Perfis proteicos e perfis de lipopolissacarídeos	116
4.4.4 Diversidade entre isolados do mesmo nódulo	118

Capítulo 5

Tolerância dos isolados de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> aos metais pesados e ao arsénio	119
5.1 Introdução	119
5.2 Material e Métodos	122
5.2.1 Material Biológico	122
5.2.2. Soluções de metais pesados e arsénio utilizadas	122
5.2.2 Determinação dos níveis de tolerância dos isolados a metais pesados e ao metalóide As	122
5.3 Resultados	123
5.3.1 Cobre	123
5.3.2 Níquel	125
5.3.3 Cobalto	126
5.3.4 Cádmio	128
5.3.5 Chumbo	130
5.3.6 Arsénio	132
5.4 Discussão	134

Capítulo 6

Avaliação da sobrevivência de isolados de <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> em solos contaminados	139
6.1 Introdução	139
6.2 Material e Métodos	142
6.2.1 Irradiação dos solos	142

6.2.2 Material biológico	142
6.2.3 Inoculação dos solos irradiados com os isolados de rizóbio	143
6.2.4 Avaliação da sobrevivência	143
6.3 Resultados	144
6.3.1 Sobrevivência das populações de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> introduzidas nos solos irradiados	144
6.4 Discussão	150
Capítulo 7	
O stresse oxidativo provocado pelo cádmio	155
7.1 Introdução	155
7.1.1 Espécies reactivas de oxigénio e danos celulares	155
7.1.2 O sistema de defesa antioxidante	157
7.2 Material e Métodos	161
7.2.1 Material biológico	161
7.2.2 Preparação das amostras	161
7.2.3 Determinação de espécies reactivas de oxigénio (ROS)	162
7.2.3.1 Conteúdo em peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂)	162
7.2.4 Determinação de danos celulares	162
7.2.4.1 Peroxidação Lipídica	162
7.2.5 Determinação da actividade das enzimas antioxidantes	163
7.2.5.1 Superóxido dismutase	163
7.2.5.2 Catalase	164
7.2.5.3 Glutathione peroxidase (GPx)	166
7.2.6 Determinação de tióis totais	167
7.2.7 Quantificação da proteína total	167
7.2.8 Análise estatística	167
7.3 Resultados	168
7.3.1 Espécies reactivas de oxigénio (ROS)	168
7.3.1.1 Conteúdo em H ₂ O ₂	168

7.3.2 Danos celulares	169
7.3.2.1 Peroxidação lipídica	169
7.3.3 Enzimas antioxidantes	170
7.3.3.1 Actividade da superóxido dismutase (SOD)	170
7.3.3.2 Actividade catalase (CAT)	171
7.3.3.3 Actividade da glutathiona peroxidase (GPx)	172
7.3.4 Conteúdo em tióis totais	173
7.3.5 Comparação dos níveis de stress oxidativo dos isolados com 80% de inibição do crescimento	173
7.3.6 Actividade da SOD e CAT em géis nativos	176
7.4 Discussão	178
7.4.1 Stresse oxidativo provocado pelo cádmio	178
7.4.2 Actividade da SOD e CAT em géis nativos	180
 Capítulo 8	
Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras	183
 Capítulo 9	
Referências Bibliográficas	191

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Concentrações máximas (mg Kg^{-1} de solo seco) de metais pesados permitidas nos solos agrícolas tratados com lamas residuais (D.R., Série I-A, Decreto Lei nº 118 de 21 de Junho de 2006).....	4
Tabela 1.2 – Fontes de informação taxonómica (adaptado de Goodfellow, 2000).....	15
Tabela 2.1 – Classificação dos solos adaptada da escala de Wentworth (Doeglas, 1968; Larsson, 1977).....	28
Tabela 2.2 – Parâmetros físico-químicos determinados nos solos BC, BD e BA da mina do Braçal. SBT – soma das bases de troca; CTC- capacidade de troca catiónica ..	31
Tabela 2.3 - Correlações de Pearson entre diferentes parâmetros físico-químicos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$)	33
Tabela 2.4 – Concentração total de metais pesados e do metalóide As (mg kg^{-1} solo seco) nos diferentes solos amostrados (BC, BD e BA). Os dados são médias \pm desvio padrão de 6 réplicas. Para o mesmo metal letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$). * Concentrações máximas (mg kg^{-1} de solo seco) de metais pesados permitidas nos solos agrícolas tratados com lamas residuais (D.R., Série I-A, Decreto Lei nº 118 de 21 de Junho de 2006)	34
Tabela 2.5 – Correlações de Pearson entre a actividade das diferentes enzimas e a concentração total de cada metal e do metalóide As presente nos solos das minas do Braçal e entre a actividade das enzimas e o pH e matéria orgânica (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$)	38
Tabela 2.6 – Correlações de Pearson entre as actividades das diferentes enzimas determinadas nos solos das minas do Braçal (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$)	39
Tabela 3.1 – Isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> recolhidos dos nódulos radiculares de plantas de trevo branco (<i>Trifolium repens</i> L.) crescidas em vasos contendo os solos dos diferentes locais da mina do Braçal (BC, BD e BA)	63
Tabela 3.2 – Presença (+) e ausência (-) de nódulos nas raízes das plantas de trevo branco, após inoculação com os diferentes isolados	65
Tabela 3.3 – Identificação dos isolados com base nas sequências parciais do gene 16S rDNA utilizando o programa BLASTN	69
Tabela 3.4 – Produção sideróforos dos diferentes isolados; (+) reduzida; (++) moderada; (+++) elevada; (-) ausência de produção de sideróforos	74
Tabela 3.5 – Capacidade de solubilizar o fosfato inorgânico pelos isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i> ; (+) presença halo (-) ausência de halo	74

Tabela 4.1 – Pesos moleculares (kb) aproximados dos plasmídeos existentes nos diferentes grupos. n.d. – não detectado	94
Tabela 4.2 – Grupos de plasmídeos e percentagens de isolados C, D e A presentes em cada grupo	97
Tabela 5.1 – Média das percentagens de inibição de crescimento dos isolados de cada local para as concentrações de Cu testadas. D1 - isolados D 1-2, D 1-3, D 1-4, D 2-1, D 2-2, D 2-4 e D 3-1; D2- isolados D 3-2, D 6-2 e D 6-4	124
Tabela 5.2 – Média das percentagens de inibição de crescimento dos isolados de cada local para as concentrações de Ni e Co testadas	126
Tabela 5.3 – Média das percentagens de inibição de crescimento dos isolados de cada local para as concentrações de Cd testadas. D1 – isolados D 1-2, D 1-4, D 2-1, D 3-1, D 3-2 e D 6-4; D2 – isolados D 1-3, D 2-2, D 2-4 e D 6-2	129
Tabela 5.4 – Média das percentagens de inibição de crescimento dos isolados de cada local para as concentrações de Pb testadas. D1 – isolados D1-3, D 2-2, D 6-2 e D 6-4; D2 - isolados D 1-2, D 1-4, D 2-1, D 2-4, D 3-1 e D 3-2; A1 – isolados A 14-2, A 16-2, A 17-3, A 18-1 e A 21-4; A2 - isolados A 6-1, A 8-1, A 10-3, A 18-2, A 18-4 e A 21-3	132
Tabela 5.5 – Média das percentagens de inibição de crescimento dos isolados de cada local para as concentrações de As testadas	132
Tabela 6.1 – Origem e características dos isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> introduzidos nos solos irradiados	142
Tabela 7.1 – Origem, eficácia simbiótica relativa (ESR) e percentagem de inibição do crescimento provocado pelo cádmio nos isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> utilizados	161

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Representação esquemática da relação entre as concentrações de iões metálicos essenciais e não essenciais e os efeitos microbiológicos provocados (adaptado de Gadd, 1992)	2
Figura 1.2 – Estádios iniciais da infecção dos pêlos radiculares pelas bactérias de rizóbio e formação do nódulo radicular (adaptado de Oldroyd e Downie, 2004)	13
Figura 1.3 – Esquema representativo dos principais mecanismos de tolerância nas bactérias. M ²⁺ -catião pesado; X- Constituintes da célula que interagem com os metais (adaptado de Haferburg e Kothe, 2007)	19
Figura 2.1 – Mapa de Portugal com a localização das minas do Braçal e enquadramento geral da zona de amostragem (Mina do Braçal)	25
Figura 2.2 – Hidrólise do diacetato de fluorescina (μg fluorescina g solo ⁻¹ fresco) determinada após um período de 20 min nos solos BC, BD e BA da mina do Braçal. Os dados são médias \pm erro padrão de 30-40 réplicas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$)	35
Figura 2.3 – Actividade da desidrogenase (μg TPF g solo ⁻¹ fresco) determinada após um período de 24 h nos solos BC, BD e BA da mina do Braçal. Os dados são médias \pm erro padrão de 30-40 réplicas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$)	36
Figura 2.4 – Actividade da catalase (μM Formaldeído g solo ⁻¹ fresco) determinada após um período de 1 h nos solos BC, BD e BA da mina do Braçal. Os dados são médias \pm erro padrão de 30-40 réplicas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$)	36
Figura 2.5 – Actividade da fosfatase ácida (μg <i>p</i> -nitrofenol g solo ⁻¹ fresco) determinada após um período de 40 min nos solos BC, BD e BA da mina do Braçal. Os dados são médias \pm erro padrão de 30-40 réplicas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$)	37
Figura 2.6 – Actividade da lipase (μg <i>p</i> -nitrofenol g solo ⁻¹ fresco) determinada após um período de 10 min nos solos BC, BD e BA da mina do Braçal. Os dados são médias \pm erro padrão de 30-40 réplicas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$)	37
Figura 3.1 - Isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> crescidos em meio AML suplementado com vermelho de Congo e em AML suplementado com azul de bromotimol	64
Figura 3.2 – Electroforese representativa da amplificação por PCR do gene <i>nodC</i> referente aos isolados C; M – marcador de pesos moleculares de 1 kb; C ⁻ - controlo negativo (sem DNA)	66

Figura 3.3 – Electroforese representativa da amplificação por PCR do gene <i>nodC</i> referente aos isolados de D; M – marcador de pesos moleculares de 1 kb; C ⁻ - controlo negativo (sem DNA)	67
Figura 3.4 – Electroforese representativa da amplificação por PCR do gene <i>nodC</i> referente aos isolados A; M – marcador de pesos moleculares de 1 kb; C ⁻ - controlo negativo (sem DNA)	67
Figura 3.5 – Electroforese representativa da amplificação por PCR do 16S rDNA referente aos isolados C; M – marcador de peso molecular de 1 kb; C ⁻ - controlo negativo (sem DNA)	68
Figura 3.6 – Electroforese representativa da amplificação por PCR do 16S rDNA referente aos isolados D; M – marcador de peso molecular de 1 kb; C ⁻ - controlo negativo (sem DNA)	68
Figura 3.7 – Electroforese representativa da amplificação por PCR do 16s rDNA referente aos isolados A; M – marcador de peso molecular de 1 kb; C ⁻ - controlo negativo (sem DNA)	68
Figura 3.8 – Médias dos pesos secos das partes aéreas das plantas de trevo branco inoculados com os isolados C. TN – inoculado com 1 ml de 0,05% (m/v) KNO ₃ ; TO – inoculada com 1 ml água destilada . ■ - eficazes; ■ - ineficazes	70
Figura 3.9 – Médias dos pesos secos das porções aéreas das plantas de trevo branco inoculados com os isolados D. TN – inoculado com 1 ml de 0,05% (m/v) KNO ₃ ; TO – inoculada com 1 ml água destilada. ■ - eficazes; ■ - ineficazes	71
Figura 3.10 – Produção de IAA pelos isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> do local BC com adição ao meio de crescimento de 100 µg ml ⁻¹ e 300 µg ml ⁻¹ de L-triptofano	72
Figura 3.11 – Produção de IAA pelos isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> do local BD com adição ao meio de crescimento de 100 µg ml ⁻¹ e 300 µg ml ⁻¹ de L-triptofano	72
Figura 3.12 – Produção de IAA pelos isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> do local BA com adição ao meio de crescimento de 100 µg ml ⁻¹ e 300 µg ml ⁻¹ de L-triptofano	73
Figura 4.1 – Frequência dos diferentes plasmídeos nos 35 isolados analisados	95
Figura 4.2 – Perfis de plasmídeos dos isolados provenientes do local BC (a), BD (b) e BA (c); R – estirpe de referência 32 TsIA	96
Figura 4.3 - Dendograma obtido com os resultados dos perfis de plasmídeos de todos os isolados analisados. Estão representados os grupos obtidos a 75% de semelhança, assinalados de I a V	98
Figura 4.4 – Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referente aos isolados C. M – marcador pesos moleculares de 1 kb; C ⁻ - controlo negativo (sem DNA)	100

Figura 4.5 – Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referente aos isolados D. M – marcador pesos moleculares de 1 kb; C ⁻ - controlo negativo (sem DNA)	100
Figura 4.6 – Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referente aos isolados A. M – marcador pesos moleculares de 1 kb; C ⁻ - controlo negativo (sem DNA)	101
Figura 4.7 – Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente aos isolados C. M – marcador pesos moleculares de 1 kb; C ⁻ - controlo negativo (sem DNA)	101
Figura 4.8 – Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente aos isolados D. M – marcador pesos moleculares de 1 kb; C ⁻ - controlo negativo (sem DNA)	102
Figura 4.9 – Gel de electroforese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente aos isolados A. M – marcador pesos moleculares de 1 kb; C ⁻ - controlo negativo (sem DNA)	102
Figura 4.10 - Dendogramas obtidos com os resultados de REP-PCR e ERIC-PCR conjugados para os isolados C (a), isolados D (b) e isolados A (c)	103
Figura 4.11 - Dendograma obtido com os resultados do REP-PCR e ERIC-PCR conjugados, juntando os 35 isolados analisados. Estão representados os grupos obtidos a 75% de semelhança, assinalados de I a VIII	104
Figura 4.12 - Gel de SDS-PAGE e respectivo dendograma, obtidos a partir do conteúdo total de proteínas solúveis dos isolados C. M – marcador de gama larga (Bio-Rad)	105
Figura 4.13 – Gel de SDS-PAGE e respectivo dendograma, obtidos a partir do conteúdo total de proteínas solúveis dos isolados D. M – marcador de gama larga (Bio-Rad)	106
Figura 4.14 – Gel de SDS-PAGE e respectivo dendograma, obtidos a partir do conteúdo total de proteínas solúveis dos isolados A. M – marcador de gama larga (Bio-Rad)	106
Figura 4.15 – Dendograma obtido com os resultados dos perfis de proteína total, juntando os 35 isolados analisados. Estão representados os grupos obtidos a 85% de semelhança, assinalados de I a VII	107
Figura 4.16 – Gel de lipopolissacarídeos e respectivo dendograma dos isolados C	108
Figura 4.17 – Gel de lipopolissacarídeos e respectivo dendograma dos isolados D	109
Figura 4.18 – Gel de lipopolissacarídeos e respectivo dendograma dos isolados A	109

Figura 4.19 – Dendograma obtido com os resultados dos perfis de LPS, juntando os 35 isolados analisados. Estão representados os grupos obtidos a 85% de semelhança, assinalados de I a VIII	110
Figura 5.1 – Crescimento dos isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> dos diferentes locais (BC, BD e BA) em meio ML suplementado com diferentes concentrações de cobre (0,125, 0,25, 0,5 e 1 mM). Os resultados são médias de 12 a 18 réplicas	123
Figura 5.2 - Crescimento dos isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> dos diferentes locais (BC, BD e BA) em meio ML suplementado com diferentes concentrações de níquel (0,125, 0,25, 0,5, 1 e 2 mM). Os resultados são médias de 12 a 20 réplicas	125
Figura 5.3 – Crescimento dos isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> dos diferentes locais (BC, BD e BA) em meio ML suplementado com diferentes concentrações de cobalto (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 e 2,5 mM). Os resultados são médias de 12 a 15 réplicas	127
Figura 5.4 - Crescimento dos isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> dos diferentes locais (BC, BD e BA) em meio ML suplementado com diferentes concentrações de cádmio (0,020, 0,065, 0,125, 0,25, 0,5 e 1 mM). Os resultados são médias de 10 a 16 réplicas	128
Figura 5.5 – Crescimento dos isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> dos diferentes locais (BC, BD e BA) em meio ML suplementado com diferentes concentrações de chumbo (0,25, 0,5, 1, 2, 3 e 4 mM). Os resultados são médias de 12 a 18 réplicas	130
Figura 5.6 – Crescimento dos isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> dos diferentes locais (BC, BD e BA) em meio ML suplementado com diferentes concentrações de arsénio (0,25, 0,5, 1, 2, 4 e 6 mM). Os resultados são médias de 10 a 16 réplicas	133
Figura 6.1 – Sobrevivência dos 8 isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> inoculados no solo controlo (BC) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9 e 12 meses)	144
Figura 6.2 – Sobrevivência dos 8 isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> inoculados no solo contaminado (BD) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9 e 12 meses)	145
Figura 6.3 – Sobrevivência dos 8 isolados de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> inoculados no solo muito contaminado (BA) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9 e 12 meses)	146
Figura 6.4 – Comportamento ao longo do tempo das estirpes isoladas do solo BC (controlo) nos 3 solos testados (BC, BD e BA)	147
Figura 6.5 – Comportamento ao longo do tempo das estirpes isoladas do solo BD (medianamente contaminado) nos 3 solos testados (BC, BD e BA)	148
Figura 6.6 – Comportamento ao longo do tempo das estirpes isoladas do solo BA (muito contaminado) nos 3 solos testados (BC, BD e BA)	149

Figura 7.1 - Stresse oxidativo e sistema enzimático de defesa antioxidante. As espécies reactivas de oxigénio (ROS) são formadas na presença de metais. A eliminação do radical $O_2^{\cdot\cdot}$ e do H_2O_2 é efectuada pela acção de várias enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). O radical $O_2^{\cdot\cdot}$ é convertido em H_2O_2 por acção da SOD, que consequentemente é eliminado pela CAT e GPx. A GPx elimina o H_2O_2 usando glutathiona (GSH) como agente redutor. A ineficácia do sistema antioxidante promove um aumento de ROS, originando vários danos oxidativos, nomeadamente: peroxidação lipídica, danos no DNA e oxidação proteica	158
Figura 7.2 - Conteúdo de H_2O_2 (nmoles H_2O_2 mg proteína ⁻¹) determinado nos diferentes isolados expostos a concentrações crescentes de cádmio (0, 20 e 35 μ M). Os valores são médias (\pm erro padrão) de 10 a 16 réplicas. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$)	168
Figura 7.3 – Níveis de peroxidação lipídica (μ mol MDA mg proteína ⁻¹) determinados nos diferentes isolados expostos a concentrações crescentes de cádmio (0, 20 e 35 μ M). Os valores são médias (\pm erro padrão) de 10 a 25 réplicas. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$)	169
Figura 7.4 – Actividade da SOD (U mg proteína ⁻¹) nos diferentes isolados expostos a concentrações crescentes de cádmio (0, 20 e 35 μ M). Os valores são médias (\pm erro padrão) de 12 a 20 réplicas. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$)	170
Figura 7.5 – Actividade da CAT (nmoles formaldeído mg proteína ⁻¹) nos diferentes isolados expostos a concentrações crescentes de cádmio (0, 20 e 35 μ M). Os valores são médias (\pm erro padrão) de 9 a 18 réplicas. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$)	171
Figura 7.6 – Actividade da GPx (U mg proteína ⁻¹) nos diferentes isolados expostos a concentrações crescentes de cádmio (0, 20 e 35 μ M). Os valores são médias (\pm erro padrão) de 9 a 17 réplicas. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$)	172
Figura 7.7 – Conteúdo em tióis totais (μ moles SH mg proteína ⁻¹) nos diferentes isolados expostos a concentrações crescentes de cádmio (0, 20 e 35 μ M). Os valores são médias (\pm erro padrão) de 10 a 18 réplicas. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$)	173
Figura 7.8 – Conteúdo de H_2O_2 (nmoles H_2O_2 mg proteína ⁻¹) (a) e níveis de peroxidação lipídica (μ mol MDA mg proteína ⁻¹) (b) determinados nos diferentes isolados crescidos na presença de concentrações de cádmio que provocaram 80% de inibição do crescimento. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$)	174

Figura 7.9 – Actividade das enzimas SOD (a) (U mg proteína ⁻¹), CAT (b) (nmoles formaldeído mg proteína ⁻¹) e GPx (c) (U mg proteína ⁻¹) determinadas nos diferentes isolados crescidos na presença de concentrações de cádmio que provocaram 80% de inibição do crescimento. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias (P< 0,05)	175
Figura 7.10 – Géis nativos de poliacrilamida corados para a actividade da SOD total em extractos celulares de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> expostos a 0, 20 e 35 µM de cádmio. a – Mn-SOD; b – Fe-SOD	176
Figura 7.11 – Géis nativos de poliacrilamida corados para a actividade da catalase em extractos celulares de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> expostos a 0, 20 e 35 µM de cádmio. As letras <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , <i>d</i> e <i>e</i> foram utilizadas para distinguir as diferentes isoformas	177

Abreviaturas

AML	agar manitol levedura
BCP	púrpura de bromocresol
BTB	azul de bromotimol
BSA	albumina do soro de bovino
CAT	catalase
CR	vermelho de Congo
CTC	capacidade de troca catiónica
DAB	3-3' - diamobenzidina
DMSO	dimetilsulfoxido
DHA	desidrogenase
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilondiamino tetracético
Eh	potencial redox
ERIC	“enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences”
ESR	eficácia simbiótica relativa
FAC	fosfatase ácida
FAL	fosfatase alcalina
FDA	diacetato de fluorescina
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico
IAA	ácido indol acético
kb	kilobase
KOH	hidróxido de potássio
LIP	lipase
LPS	lipopolissacarídeos
mA	miliâmpere

min	minuto
me	miliequivalentes
ml	mililitro
m/v	massa/volume
mM	milimolar
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotido fosfato
O₂⁻	radical superóxido
OH⁻	radical hidroxilo
pb	pares de bases
PCR	“polymerase chain reaction”
Purpald	4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole
REP	“repetitive extragenic palindromic sequences”
RNA	ácido ribonucleico
ROS	espécies reativas de oxigénio
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SOD	superóxido dismutase
seg	segundo
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBE	tampão Tris-Borato-EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TE	tampão Tris-EDTA
TEA	triethylamina
TEMED	N',N',N',N'- tetrametil-etilenodiamina
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propano
TY	meio triptona-extracto de levadura
V	volt
v/v	volume/volume
μl	microlitro
μM	micramolar

Capítulo 1

Introdução geral

1.1 Contaminação dos solos por metais pesados

A contaminação dos solos por metais pesados é motivo de grande preocupação em muitos países, tendo-se tornado um importante objecto de estudo para a comunidade científica, não só devido à toxicidade dos metais para todos os organismos, em particular para o Homem, como também pela sua persistência no solo (Ghorbani et al., 2002; van Gestel, 2008; Welp, 1999). Em certas regiões, a acumulação de metais pesados tem atingido níveis preocupantes para o equilíbrio dos ecossistemas, sendo na sua maioria devido à acção humana (Alloway, 1995a; Gülser e Erdoğan, 2008; van Gestel, 2008). A actividade industrial e as sucessivas descargas de resíduos industriais e/ou domésticos para o ambiente resultam numa forte contaminação de muitos habitats terrestres e aquáticos. Os efluentes industriais podem conter grandes quantidades de metais potencialmente tóxicos, como o Cd, Hg, Pb, Ni, Zn e Cu (Obbard et al., 1993). Estes persistem nas camadas cultiváveis do solo (McGrath e Lane, 1989) durante longos períodos de tempo, podendo causar efeitos ecotoxicológicos graves nas plantas e nos microrganismos do solo (He et al., 2005; McGrath et al., 1988).

Os metais pesados constituem um grupo de 40 elementos cuja densidade atómica é superior a 5 g cm^{-3} (Alloway, 1995a; Sanitta-di Toppi e Gabbrielli, 1999; Trevors et al., 1986). Alguns metais pesados como o Ni, Cu, Co e Zn exercem funções importantes em reacções bioquímicas, sendo essenciais ao crescimento e desenvolvimento das

comunidades microbianas (Gadd, 1992; Higgins e Burns, 1975), uma vez que são co-factores vitais de metalo-proteínas e enzimas (Doelman et al., 1994; Guzzo et al., 1994; Outten et al., 2000). Wilson e Reisenauer (1970) demonstraram que a adição de 100 mM de Zn ao meio estimula o crescimento de *Rhizobium*. Também Klucas e seus colaboradores (1983) observaram que o Ni é essencial ao crescimento de *Bradyrhizobium japonicum*. No entanto, outros metais como o Cd, Pb, Hg e Au não possuem qualquer função biológica e/ou fisiológica conhecida (Gadd, 1992; Valls e de Lorenzo, 2002) provocando efeitos nocivos nos microrganismos (Outten et al., 2000), sendo portanto considerados elementos não essenciais. No caso dos iões metálicos essenciais existe uma gama de concentrações que pode limitar o crescimento óptimo dos microrganismos. Contudo, acima de determinados limites a concentração metálica pode tornar-se tóxica (Chaudhary et al., 2004; Nies, 1999). Por outro lado, os iões metálicos não essenciais provocam toxicidade a qualquer concentração, existindo no entanto um limite até onde o organismo consegue tolerar os efeitos nocivos (Figura 1.1).

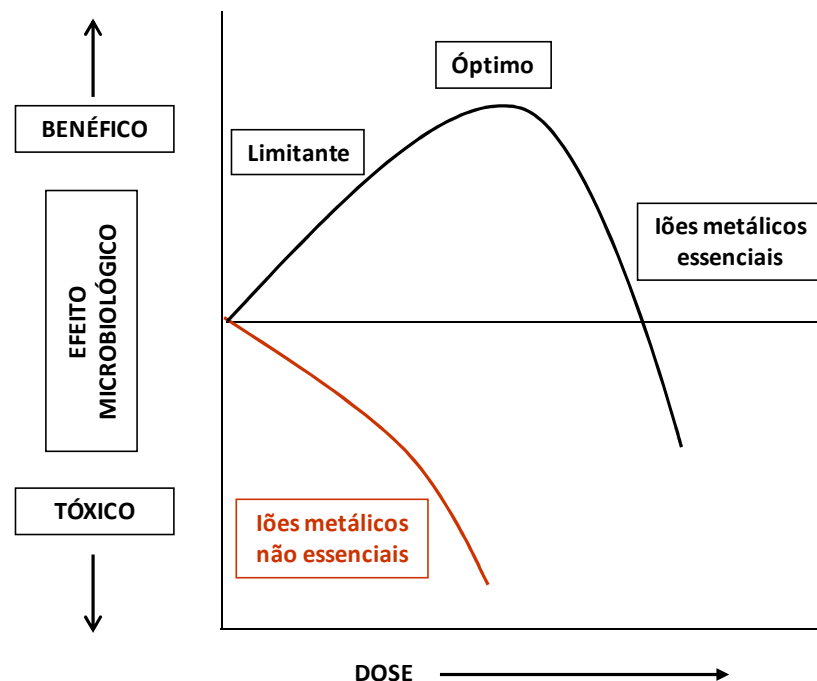


Figura 1.1 - Representação esquemática da relação entre as concentrações de iões metálicos essenciais e não essenciais e os efeitos microbiológicos provocados (adaptado de Gadd, 1992).

1.1.1 Fontes de contaminação por metais pesados

Muitos metais pesados não são passíveis de serem transformados em compostos menos tóxicos, podendo persistir indefinidamente no meio ambiente, provocando um efeito cumulativo e dificultando a recuperação dos solos contaminados (Chander et al., 2001; Lestan et al., 2008; Robinson et al., 2001). Por este motivo, na maioria dos países industrializados a contaminação dos solos têm sido motivo de grande preocupação sobretudo nas áreas com maior densidade populacional (Eijsackers, 1998; Wyszowska, 2002). Além da contaminação natural resultante de processos geológicos, a contaminação dos solos com metais pesados tem origem em diversas fontes antropogénicas (El-Kenawy et al., 1997). De entre essas fontes é possível destacar os depósitos de lixo industriais e/ou domésticos que podem contaminar o meio ambiente circundante devido a processos de lixiviação; descargas de efluentes resultantes da indústria metalúrgica e fundições; exploração de minas e a aplicação directa de compostos com elevadas concentrações de metais, como é o caso das lamas residuais e fertilizantes (Carrasco et al., 2005; Ceribasi e Yetis, 2001; Giller et al., 1989; Malik, 2004; McGrath et al., 1995; Mulligan et al., 2001; Robinson et al., 2001; Shen et al., 2005; van Straalen, 2002).

Os solos agrícolas apresentam frequentemente carências nutritivas que dificultam o crescimento e o desenvolvimento das plantas, sendo necessária a aplicação de fertilizantes e estrumes para as colmatar. A aplicação de fertilizantes fosfatados constitui uma fonte de contaminação por metais em todo o mundo (Alloway, 1995c; Carnelo et al., 1997; He et al., 2005; Nicholson et al., 2003). Vários estudos demonstraram que a origem da rocha fosfatada (fosforito) utilizada na manufactura destes fertilizantes é determinante na concentração de metais que poderá existir no produto (Alloway, 1995c; He et al., 2005; Kabata-Pendias e Pendias, 2001). Em média a rocha fosfatada pode conter 11, 25, 188, 32, 10 e 239 mg kg⁻¹ de As, Cd, Cr, Cu, Pb e Zn, respectivamente (Mortvedt e Beaton, 1995).

O tratamento dos resíduos urbanos e industriais resulta na produção de elevadas quantidades de lamas residuais e a sua eliminação é um grave problema ambiental (Alloway e Steinnes, 1999; Davis, 1984; Giller e McGrath, 1989; Kizilkaya e Bayrakli, 2005; Pathak et al., 2009; Singh e Agrawal, 2008). A adição de lamas residuais aos solos

agrícolas pode constituir uma importante fonte de nutrientes essenciais às plantas e microrganismos, sobretudo de azoto e fósforo, além de melhorar as características físicas do solo (Abd-Alla et al., 1999; Beck et al., 1996; Chander e Brookes, 1993; Giller et al., 1989; McGrath et al., 1988; Singh e Agrawal, 2008). Contudo, a presença de metais pesados nas lamas reduz a sua utilidade como fertilizante (Singh e Agrawal, 2008). A concentração média de metais pesados nas lamas varia entre 0,5 e 2%, podendo atingir valores de 6% nalguns casos (Jain e Tyagi, 1992; Lester et al., 1983). A aplicação sucessiva de lamas nos solos pode levar ao aumento da concentração de metais no solo. Chang et al. (1984) mostraram que mais de 90% do Cd, Zn, Pb, Cr, Cu e Ni presente nas lamas permaneceu na camada cultivável do solo (0-15 cm), após 6 anos de aplicações consecutivas. Esta acumulação provoca alterações nas populações microbianas do solo, assim como no crescimento e desenvolvimento vegetal (Giller e McGrath, 1989).

Devido aos efeitos tóxicos que os metais pesados podem exercer nas culturas e animais de pastoreio e ao elevado risco de biomagnificação para a cadeia alimentar, a regulamentação das concentrações máximas permissíveis nos solos tornou-se urgente. Deste modo, a União Europeia (CEC, 1986) fixou valores máximos permissíveis para as concentrações dos metais pesados após a aplicação de lamas residuais que foram mais tarde adaptados para Portugal (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 - Concentrações máximas (mg Kg^{-1} de solo seco) de metais pesados permitidas nos solos agrícolas tratados com lamas residuais (D.R., Série I-A, Decreto Lei nº 118 de 21 de Junho de 2006).

Metais	pH < 5,5	5,5 < pH < 7,0	pH > 7,0
Cd	1	3	4
Pb	50	300	450
Hg	1	1,5	2
Zn	150	300	450
Cr	50	200	300
Ni	30	75	110
Cu	50	100	200

1.1.2 Biodisponibilidade dos metais pesados

A quantidade de metais acumulados no solo, resultante da poluição ambiental, depende da escala de emissão, do transporte do metal a partir da fonte e também da retenção do metal no solo (Alloway e Steinnes, 1999). O risco potencial dos metais para o Homem e para o meio ambiente depende da sua biodisponibilidade. O termo biodisponibilidade pode ser definido como a fracção de metal que está ou pode estar disponível para ser absorvida e causar efeitos nefastos nos organismos (Peijnenburg, 2004).

A biodisponibilidade dos metais no solo, assim como o seu destino são condicionados por um balanço relativo entre processos de adsorção, lixiviação e absorção pelas plantas (Allen, 2002; He et al., 2005; Luoma e Rainbow, 2005). Por outro lado, estes mesmos processos podem ser afectados por propriedades físico-químicas do solo, como o pH, o potencial redox, o conteúdo em matéria orgânica e o conteúdo em argilas (Allen, 2002; Alloway e Steinnes, 1999; Anderson e Christensen, 1988; Davies 1989; Ibekwe et al., 1998; Kabatas-Pendias e Pendias, 2001; Luoma e Rainbow, 2005; McGrath et al., 1988).

O pH do solo é um dos factores que influencia fortemente a biodisponibilidade e toxicidade dos metais pesados, já que pode contribuir para a sua solubilização e especiação (Alloway, 1995b; Chaudri et al., 2000). Num pH ácido os metais existem na sua forma livre, contudo, a pH alcalino os catiões pesados precipitam sob a forma de hidróxidos ou óxidos insolúveis (Gadd e Griffiths, 1978). Deste modo, em solos ácidos os metais possuem uma maior mobilidade, ficando mais disponíveis para serem absorvidos pelas plantas e microrganismos (Gadd e Griffiths, 1978; Ibekwe et al., 1997). Segundo Sanders et al. (1986) por cada unidade decrescente de pH ocorre um aumento de duas vezes na concentração de metais na solução do solo.

O potencial redox (Eh) de um solo dá uma medida da tendência do solo para receber ou fornecer electrões e é controlado pelo tipo e proporções das substâncias oxidantes e redutoras que o solo contém. Se este está deficiente em oxigénio, devido ao seu elevado teor em água, e o seu grau de difusão é inadequado para manter a respiração aeróbia, desenvolvem-se várias populações bacterianas que utilizam outros receptores de

electrões para a oxidação respiratória. Como consequência, várias substâncias orgânicas e inorgânicas são convertidas a um estado reduzido, traduzindo-se no abaixamento do potencial redox do solo (Alloway, 1995b). A biodisponibilidade dos metais pesados pode ser afectada indirectamente pelas condições redutoras do meio, uma vez que o ião sulfato é reduzido a sulfito quando o potencial redox é inferior a -119 mV, o que pode levar à precipitação dos sulfitos de metais como FeS_2 , HgS , CdS , CuS , MnS e ZnS e consequentemente a uma diminuição da sua biodisponibilidade (Alloway, 1995b).

A matéria orgânica e as partículas argilosas também podem diminuir consideravelmente a toxicidade dos metais para os microrganismos do solo (Gadd e Griffiths, 1978). Quer a matéria orgânica, quer as partículas argilosas têm a superfície carregada negativamente, o que permite a ligação dos catiões metálicos, tornando-os menos disponíveis e consequentemente menos tóxicos para os microrganismos (Alloway, 1995b; Chander e Brookes, 1991; McGrath et al., 1995).

Os exsudados das raízes das plantas influenciam a disponibilidade dos metais, quer directamente como é o caso do Fe^{3+} , quer através dos efeitos que os exsudados têm na actividade microbiológica e na química da rizosfera (Giller et al., 1998). Os microrganismos também podem alterar a disponibilidade dos metais na sua vizinhança devido à acidificação localizada do meio ou à produção de compostos que complexam os metais. Como exemplo, temos as bactérias oxidantes de ferro que interferem no processo de oxidação das pirites, onde a libertação de H_2SO_4 pode causar uma extrema acidificação causando um aumento na biodisponibilidade dos metais (Evangelou e Zhang, 1995; Giller et al., 1998; Haforburg e Knothe, 2007).

1.2 Influência dos metais pesados na qualidade do solo

A qualidade de um solo depende, em parte, da sua composição natural mas também da manipulação humana. Os factores antropogénicos que podem influenciar a qualidade de um solo podem dividir-se em duas categorias: aqueles que estão associados à poluição e os que decorrem de um aumento da utilização do solo (Gianfreda e Bollag, 1996). A contaminação por descargas de efluentes industriais e municipais e/ou o cultivo intensivo sem rotação de culturas são as principais causas para a degradação do solo e

redução da produtividade (Edwards, 2002). O solo é um recurso natural vital que não tem padrões de qualidade bem definidos (Doran e Parkin, 1994). Ao longo da última década, a qualidade do solo tem sido um dos tópicos mais discutidos pela comunidade científica, sendo o principal objectivo definir a qualidade do solo e determinar parâmetros e métodos que permitam a sua avaliação (Gil-Sotres et al., 2005). Embora existam diferentes definições para a qualidade do solo, a proposta por Karlen et al. (1997) é amplamente aceite. Estes autores definem a qualidade de um solo como a capacidade que um determinado solo tem de sustentar a produtividade vegetal e animal, promover a manutenção e aumento da qualidade da água e do ar e que simultaneamente suporta a saúde humana e habitacional.

A selecção de indicadores para avaliar a qualidade de um solo deve obedecer a diversos requisitos como: 1) a sensibilidade para a presença do maior número de agentes degradantes possível; 2) a consistência na direcção da mudança em resposta a um dado contaminante e 3) a capacidade em reflectir os diferentes níveis de deterioração dos solos (Elliot, 1994). De um modo geral, os parâmetros físico-químicos têm um peso menor na avaliação da qualidade de um solo uma vez que só se alteram quando o solo é sujeito a mudanças drásticas, sendo por isso pouco sensíveis (Filip, 2002). Por outro lado, os parâmetros biológicos e bioquímicos são sensíveis a pequenas alterações do solo na presença de um qualquer agente degradante (Klein et al., 1985; Nannipieri et al., 1990; Yakovchenko et al., 1996).

Visser e Parkinson (1992) sugeriram que as propriedades biológicas e bioquímicas mais úteis para determinar a deterioração da qualidade de um solo são aquelas que estão mais próximas dos ciclos de nutrientes, incluindo a respiração, a biomassa microbiana, a capacidade de mineralização do azoto e a actividade das enzimas do solo.

As enzimas do solo catalisam todas as reacções bioquímicas e são parte integral do ciclo de nutrientes (Bandick e Dick, 1999). Pensa-se que estas enzimas têm origem primariamente nos microrganismos mas também podem derivar das plantas e animais (Tabatabai, 1994). De um modo geral, estão associadas à proliferação de células viáveis podendo, contudo, ser libertadas para a solução do solo por células mortas (Tabatabai, 1994).

A contaminação por metais pesados pode influenciar os processos bioquímicos do solo, afectando quer a proliferação microbiana, quer a actividade enzimática (Baran et al., 2004; Gianfreda et al., 2005). Deste modo, as enzimas do solo têm sido sugeridas como potenciais indicadores da qualidade do solo devido a constituírem uma medida da actividade microbiana e por estarem estritamente relacionadas com os ciclos de nutrientes. Por outro lado, respondem rapidamente a alterações causadas quer por factores naturais quer por factores antropogénicos (Calderon et al., 2000; Chaperon e Sauvé, 2007; Colombo et al., 2002; Dick, 1997; Drijber et al., 2000; Gianfreda e Bollag, 1996; Gianfreda et al., 2005; Nannipieri et al., 2002; Shen et al., 2005; Trasar-Cepeda et al., 2000).

1.3 Efeitos dos metais pesados nos microrganismos do solo

Concentrações elevadas de metais pesados nos solos podem afectar qualitativa e quantitativamente a composição das comunidades microbianas. Vários estudos demonstraram que os metais influenciam os microrganismos afectando adversamente o seu crescimento, morfologia e metabolismo, resultando num decréscimo da biomassa e diversidade (Bååth 1989; Barkay et al. 1985; Doelman et al., 1994; Ellis et al., 2003; Kandeler et al., 1996; Malik e Ahmad, 2002; Reber, 1992).

Os metais pesados exercem uma acção inibitória nos microrganismos através do bloqueio de grupos funcionais de moléculas importantes, como enzimas e polinucleótidos, bloqueio de sistemas de transporte de nutrientes, deslocação e substituição de iões essenciais (Bruins et al., 2000; Gadd, 1992; Gadd e Griffiths, 1978); ou alteração da estrutura conformacional de ácidos nucleicos e proteínas (Bruins et al., 2000; Guzzo et al., 1994). Além dos efeitos tóxicos directos, os metais podem exercer uma pressão selectiva na comunidade microbiana, resultando na presença de microrganismos mais tolerantes nas áreas poluídas quando comparados com os presentes em solos não contaminados. Esta selecção pode conduzir ao estabelecimento de populações resistentes/tolerantes aos metais (Angle et al., 1993a; Bååth, 1992; Bååth et al., 1998; Díaz-Raviña e Bååth, 1996). Nos últimos anos vários autores referenciaram o aumento da tolerância a metais pesados de bactérias isoladas de locais contaminados (Carrasco et al.,

2005; Díaz-Raviña et al., 1994; Pereira et al., 2006a). Pereira et al. (2006a) isolaram bactérias de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* tolerantes a diferentes metais (Zn, Cd, e Pb) de solos sujeitos a contaminação industrial e de solos de minas.

A utilização de bactérias tolerantes a metais pesados como bioindicadores de ambientes poluídos é um método que tem vindo a ser progressivamente utilizado, especialmente pela sua sensibilidade, constituindo deste modo, uma ferramenta importante na detecção dos efeitos sub-letais de muitos compostos poluidores. A combinação de bioensaios (peixes, algas, bactérias) tem sido fortemente recomendada no desenvolvimento de abordagens ecotoxicológicas integradas (Hassen et al., 1998).

1.3.1 Efeitos dos metais pesados no rizóbio e na fixação de azoto

O ecossistema microbiano do solo é funcionalmente complexo, contendo grupos chave de microrganismos que possuem um papel fundamental na manutenção da fertilidade do solo, o que está directamente relacionado com a nutrição vegetal (Ghorbani et al., 2002; Obbard, 2001). A fertilização do solo pode ocorrer através da acção directa de microrganismos decompositores da matéria orgânica, transformando-a em matéria mineral, e também através de relações simbióticas entre microrganismos e plantas (Giller et al., 1998).

Os microrganismos do solo são sensíveis a exposições prolongadas de metais pesados (Broos et al., 2004, 2005; Giller et al., 1989; Giller et al., 1998). Estes podem afectar a sobrevivência da população bacteriana, assim como as suas actividades. O efeito dos metais na fixação biológica de azoto (FBA) tem sido objecto de intensa investigação. Segundo McGrath et al. (1988) a fixação de N_2 pelo trevo branco (*Trifolium repens* L.) foi completamente suprimida devido a elevadas concentrações de metais pesados presentes em solos de Woburn (Inglaterra), após a aplicação de lamas residuais durante 20 anos. Os resultados obtidos por estes autores foram confirmados por outros estudos onde foi utilizado o mesmo solo (Angle et al., 1993b). No entanto, Obbard e colaboradores (1993) verificaram a presença de estirpes de *Rhizobium* capazes de nodular e de fixar azoto eficazmente, em solos contaminados. Estes resultados foram obtidos apenas quando o trevo era indígena do solo, tendo-se concluído que o *Rhizobium* que nodulava o trevo era

incapaz de sobreviver fora do ambiente protector do nódulo em solos contaminados. Este facto já tinha sido provado por Giller et al. (1989), estes autores realizaram ensaios com solos contaminados inoculados com estirpes eficazes de *Rhizobium*, tendo de seguida semeado trevo branco. As plantas apresentaram um crescimento normal e nódulos radiculares com *Rhizobium* eficaz. Contudo, quando o solo foi inoculado com *Rhizobium* e incubado durante dois meses antes de ser semeado com trevo branco, não se verificou a existência de nódulos eficazes, a não ser quando o inóculo adicionado ao solo foi superior a 10^7 células g⁻¹ solo. Os resultados indicaram que baixas concentrações de metais no solo foram suficientes para inviabilizar a permanência do *Rhizobium* eficaz em vida livre.

1.4 Simbiose *Rhizobium*-leguminosa

Nos países em desenvolvimento a gestão do azoto (N) no ambiente é essencial para uma agricultura sustentável (Rehman e Nautiyal, 2002). Os actuais 6 biliões de pessoas na Terra consomem uma média de 11 g de N por pessoa por dia (Fink et al., 1999). Por outro lado, os produtos vegetais constituem mais de 80% da dieta alimentar nos trópicos e subtrópicos. Com o aumento anual de 1,4% da população mundial e com a expectativa de atingir 8,9 biliões em 2050 (United Nations, 2004), será necessário um drástico aumento do cultivo de culturas para manter os níveis actuais da dieta proteica e calórica.

A deficiência em azoto é frequentemente um dos factores limitantes do crescimento vegetal (Franco e Döbereiner, 1994). Embora a atmosfera contenha 78% de N₂, a sua forma não é directamente assimilável pelas plantas (Hubbell, 1993) devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos do N₂, que é uma das mais fortes encontradas na natureza (Manyani et al., 2001). O azoto diatómico, quimicamente inerte, pode tornar-se acessível às plantas por fixação biológica, o que ocorre habitualmente por endossimbiose entre leguminosas e bactérias com capacidade de reduzir o azoto diatómico a azoto amoniacal (van Rhijn e Vanderleyden, 1995; Velagaleti e Cline, 1995).

A fixação biológica de azoto é de extrema importância para a manutenção da fertilidade do solo e para o desenvolvimento de boas práticas agrícolas, permitindo manter as quantidades de azoto necessárias ao crescimento das plantas (Atlas e Bartha,

1987; Hubbell, 1993). A acção dos organismos fixadores de azoto garante um reservatório inesgotável de azoto na atmosfera e mantém o ecossistema em equilíbrio. Por outro lado, reduz a aplicação de doses excessivas de compostos azotados produzidos industrialmente, como o nitrato, evitando a contaminação de águas superficiais e subterrâneas e alterando a qualidade dos vegetais consumidos pelo Homem, levando ao desenvolvimento de uma agricultura menos agressiva para o ambiente e mais saudável (Freiberg et al., 1997; Peoples e Craswell, 1992; Stephens e Rask, 2000).

A associação simbiótica entre leguminosas e bactérias dos géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Azorhizobium* é de longe o maior contribuinte para o fornecimento de N₂ fixado biologicamente (Atlas e Bartha, 1987; McGrath et al., 1995; Somasegaran e Hoben, 1994). As várias combinações possíveis entre *Rhizobium* e leguminosas variam não só na capacidade de formar nódulos como também na capacidade de fixar N₂. Em alguns casos, os nódulos possuem estirpes de rizóbio que fixam grandes quantidades de azoto diatómico, enquanto noutros a fixação de azoto é reduzida ou nula e por isso a associação é considerada ineficaz. As leguminosas noduladas com estirpes eficazes podem fixar quantidades apreciáveis de azoto. Estudos realizados mostraram que o N₂ fixado pela simbiose entre o *R. leguminosarum* e *Vicia faba* pode atingir entre 240 a 648 Kg ha⁻¹ano⁻¹ (Somasegaran e Hoben, 1994) enquanto em *Pisum sativum* atinge 100 a 250 Kg ha⁻¹ano⁻¹ (Brewing et al., 1993) e em *Trifolium repens* 200 Kg ha⁻¹ano⁻¹ (Broadbent et al., 1982).

A associação simbiótica entre leguminosas e bactérias do género *Rhizobium* culmina na formação de órgãos especializados (nódulos radiculares). A formação do nódulo implica um reconhecimento específico entre a planta hospedeira e o microsimbionte, assim como alterações na estrutura e na bioquímica de ambos.

1.4.1 Processo de infecção e nodulação das raízes pelo rizóbio

A infecção da raiz pelo rizóbio é iniciada com um processo de pré-infecção que ocorre na rizosfera (Figura 1.2). O processo inicia-se com a libertação de uma série de exsudados das raízes da planta aos quais o rizóbio responde por quimiotaxis positiva movendo-se para junto da planta hospedeira (Drozdowicz, 1991; Dowling e Broughton, 1986). Os exsudados das plantas são constituídos por aminoácidos, ácidos dicarboxílicos e também por flavonóides que activam a expressão de um grupo de genes necessário para a nodulação (genes *nod* ou *nol*) (Downie e Johnston, 1988). Em seguida, as bactérias aderem aos pêlos radiculares das plantas, num processo relativamente estável e irreversível (Hungria et al., 1997), provocando a deformação e curvatura dos pêlos radiculares. À medida que o pêlo radicular vai crescendo a bactéria fica envolvida entre as paredes celulares e o pêlo. O processo de infecção inicia-se pela degradação da parede celular do hospedeiro sugerindo a acção de enzimas hidrolíticas produzidas pela bactéria. No entanto, existem algumas dúvidas relativamente a este mecanismo e em alternativa pensa-se que o rizóbio pode activar genes na planta hospedeira que são responsáveis por este processo, como sucede quando as células epidérmicas crescem e formam o pêlo radicular (Kijne, 1992). A penetração do rizóbio dá-se pela invaginação da membrana plasmática levando à formação de uma estrutura tubular designada por cordão de infecção. O cordão de infecção alonga-se em direcção às células em divisão no córtex da raiz da planta constituindo o nódulo primário; nessa etapa, as bactérias presentes no interior do cordão de infecção continuam a multiplicar-se. Ao chegar às proximidades do nódulo primário, o cordão de infecção ramifica-se para invadir as células vegetais. Pequenos grupos de bactérias contidas no interior de vesículas membranosas são libertados dentro do citoplasma das células vegetais, diferenciando-se fisiológica e morfológicamente em bacteróides. Os bacteróides ficam envolvidos pela membrana plasmática que se transforma na membrana peribacteroidal e ficam rodeados pelo fluído peribacteroidal constituindo assim os simbiossomas (Roth et al., 1988).

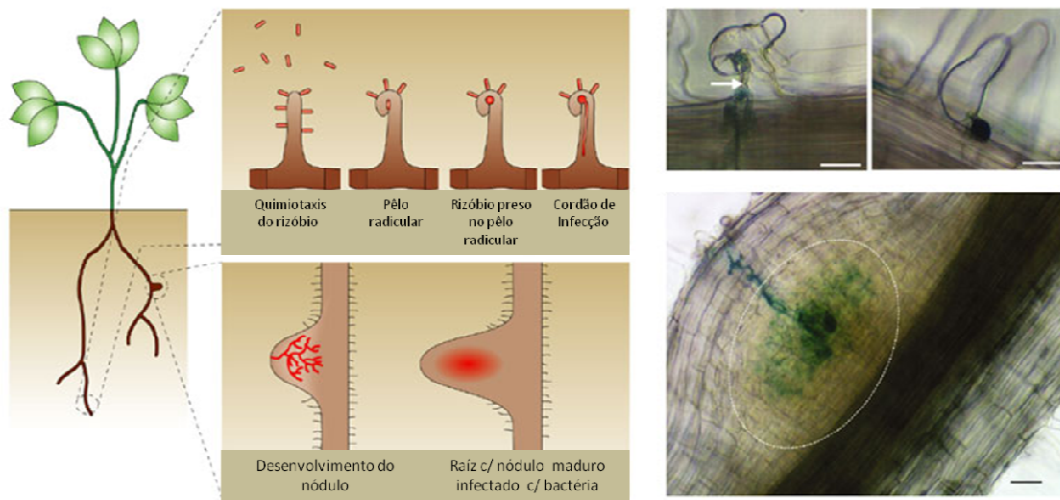


Figura 1.2 – Estádios iniciais da infecção dos pêlos radiculares pelas bactérias de rizóbio e formação do nódulo radicular (adaptado de Oldroyd e Downie, 2004).

1.4.2 Genes que controlam a nodulação

Os genes de rizóbio essenciais para o processo de infecção e formação dos nódulos podem ser divididos em dois grupos: 1) os genes envolvidos na formação da superfície bacteriana, como são o caso dos genes necessários à síntese de exopolissacarídeos (genes *exo*), lipopolissacarídeos (genes *lps*) e polissacarídeos capsulares (genes *ndv*); e 2) os genes de nodulação (*nod* ou *nol*). Mutações nos genes do primeiro grupo provocam distúrbios no processo de infecção a vários níveis, como é o caso da incapacidade de formar o tubo de infecção, resultando em nódulos ineficazes (Nod^+ Fix $^-$). Similarmente, a inativação dos genes de nodulação pode resultar em ausência de nodulação ou em nodulação não eficaz (Kondorosi et al., 1984).

A maioria dos genes de nodulação não são expressos nas células em cultura, sendo apenas induzidos na presença da planta hospedeira (Fisher e Long, 1992). Os genes que controlam a especificidade para o hospedeiro são designados por genes *nod* (*hsn*) e determinam a especificidade da bactéria para uma dada planta hospedeira. Entre os genes de nodulação encontra-se um grupo estrutural e funcionalmente conservado na maioria dos rizóbios, que correspondem ao *nodD*, *nodABC* e *nodIJ* e que intervêm numa série de etapas do processo de nodulação, nomeadamente na curvatura do pêlo

radicular, formação do cordão de infecção e produção de factores que estimulam as alterações morfológicas na raiz e formação dos nódulos (Long, 1989).

1.4.3 Fixação de azoto

A fixação simbiótica de azoto inicia-se após a formação de nódulos eficazes. A planta fornece à bactéria as quantidades necessárias de oxigénio, ácidos dicarboxílicos e uma fonte de energia (malato, succinato ou cetoglutamato). Por outro lado, a bactéria reduz o N_2 a NH_3 (Bergensen, 1965). Este processo é catalisado pela enzima nitrogenase. Este complexo enzimático é constituído por dois componentes: a proteína molibdénio-ferro ou Componente I e a Fe-proteína ou Componente II que é sintetizada nos bacteróides (Peters et al., 1995). A Mo-Fe é um tetramero com 220 kDa e a Fe-proteína é um homodímero com peso molecular de 60 a 64 kDa. O complexo nitrogenase é rapidamente e irreversivelmente desnaturado pelo O_2 , pelo que esta enzima é funcional apenas perante concentrações baixas de oxigénio. No entanto, a fixação do N_2 requer muita energia pelo que o ATP necessário para o processo deriva da fosforilação oxidativa que ocorre nas células do rizóbio. A leghemoglobina facilita a difusão do O_2 através do citoplasma das células vegetais para as células bacterianas nas concentrações necessárias para manter a fosforilação sem interferir com a actividade da nitrogenase.

Os genes de fixação de azoto estão divididos em 2 grupos: 1) os genes *nif*, que apresentam grande homologia com os genes identificados em organismos fixadores de azoto de vida livre, como *Klebsiella pneumoniae* e 2) os genes *fix* que apenas são encontrados em organismos simbióticos como é o caso do *Rhizobium*.

Na maioria das espécies de rizóbio estudadas, os genes que controlam a nodulação (*Nod*), a especificidade do hospedeiro (*hsn*) e a fixação de N_2 (*nif* e *fix*), estão geralmente localizados no plasmídeo simbiótico (pSym) (Martinez et al., 1990). No entanto, em *Rhizobium loti*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* spp., os genes relacionados com a simbiose estão localizados no cromossoma (Appelbaum et al., 1988; Chua et al., 1985).

1.5 Diversidade microbiana

O solo é o habitat de milhares de microrganismos, existindo uma grande variedade de fungos, actinobactérias, algas, protozoários e diferentes tipos de bactérias que variam na sua fisiologia, temperatura óptima e uso de oxigénio. De acordo com Torsvik et al. (1990) a diversidade genética das bactérias do solo é extremamente elevada, existindo cerca de 4000 genótipos diferentes, estimando-se a existência de 13000 espécies por grama de solo.

A classificação e a identificação de bactérias é de crucial importância na microbiologia ambiental, industrial e agronómica e na ecologia microbiana. Existe um vasto número de métodos que podem ser aplicados à identificação e classificação dos microrganismos. Cada um dos quais permite um determinado nível de classificação filogenética, desde o género e espécie à biovariedade e estirpe (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 – Fontes de informação taxonómica (adaptado de Goodfellow, 2000).

Componente da célula	Análise	Nível taxonómico		
		Género ou acima	Espécie	Subespécie ou estirpe
DNA cromossomal	Composição base (% G+C)	✓	✓	
	Hibridação DNA:DNA		✓	✓
	Padrões de restrição (RFLP)		✓	✓
Segmentos de DNA	Sondas de DNA	✓	✓	✓
	Sequenciação de DNA	✓	✓	✓
	DNA "Fingerprinting" (PCR-RFLP)		✓	✓
DNA ribossomal	Hibridação DNA:rRNA	✓	✓	
Proteínas	Sequência aminoácidos	✓	✓	
	Perfis electroforéticos		✓	✓
	Comparações serológicas	✓	✓	✓
Marcadores químicos	Peptidoglicano	✓		
	Ácidos gordos	✓	✓	
	Polissacarídeos	✓	✓	
	Poliaminas	✓		
	Lípidos polares	✓	✓	
Organismos inteiros	Pirólise de espectrometria de massa		✓	✓
	Testes imunoenzimáticos		✓	✓
Características expressas	Morfologia	✓	✓	
	Fisiologia	✓	✓	

As técnicas que nos permitem obter informações em relação às comunidades microbianas do solo podem ser baseadas no facto dos microrganismos poderem ou não ser cultiváveis. Contudo, as técnicas baseadas nos métodos cultiváveis não representam a diversidade real (Amann et al., 1995), uma vez que o número de espécies cultiváveis representa apenas 1% dos microrganismos existentes no solo (Giller et al., 1997; Pace, 1997; Torsvik et al., 1998; Trevors, 1998). Devido a esta limitação foi necessário desenvolver novos métodos complementares. Uma das técnicas mais utilizadas na detecção e identificação de microrganismos em ambientes naturais e que ganhou grande impulso nos últimos anos é a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction). Em estudos de diversidade de microrganismos a técnica de PCR é utilizada em várias metodologias como o DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), PCR de sequências repetitivas de DNA (rep-PCR usando *primers* REP, ERIC ou BOX) entre outros.

Os métodos de REP-PCR (repetitive extragenic palindromic sequences – PCR), ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus – PCR) e BOX-PCR baseiam-se na amplificação de sequências repetitivas (rep-elements) do genoma bacteriano (Versalovic et al., 1994). Quando um destes elementos repetitivos é detectado dentro de uma distância amplificável durante a reacção de polimerase em cadeia, um produto de tamanho característico é gerado, de modo que o genoma possa gerar um padrão de polimorfismo num gel. O método constitui uma poderosa ferramenta para estudar a diversidade genética intraespecífica ao nível da estirpe. A análise da impressão digital gerada a partir de genomas distintos tem sido usada na família das *Rhizobiaceae* para separação de estirpes muito próximas como por exemplo para *B. japonicum* (Judd et al., 1993; Vinuesa et al., 1998), *R. tropici* (van Berkum et al., 1994), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Ibekwe et al., 1997; Leung e Bottomley, 1994), *R. galegae* (Selenska-Pobell et al., 1995) e *Sinorhizobium meliloti* (de Bruijn, 1992; Rossbach et al., 1995).

Desde a década de 80 que também se tem utilizado com frequência os perfis eletroforéticos de lipopolissacarídeos (LPS) em estudos de diversidade e identificação de populações bacterianas (de Maagd et al., 1988; de Weger et al., 1987). Os perfis de LPS são característicos de cada bactéria unindo-se assim, à rapidez, sensibilidade, alta

reprodutibilidade e baixo custo, esta técnica tornou-se uma ferramenta útil para a sua utilização em estudos de diversos microrganismos (Hitchcock e Brown, 1983; Lindström e Zahran, 1993; Siverio et al., 1993). Outro processo de caracterização que tem fornecido informações valiosas nos estudos de identificação de microrganismos é o perfil electroforético de proteínas. A electroforese em gel de poliacrilamida de proteínas totais (SDS-PAGE) produz padrões de bandas que podem ser considerados impressões altamente específicas de cada estirpe bacteriana (Yamaoka-Yano e Valarini, 1998).

1.6 Respostas dos microrganismos aos metais pesados

1.6.1 Indução do sistema antioxidante

Os metais podem induzir stresse oxidativo através de um aumento na produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS – do inglês *reactive oxygen species*). A primeira linha de defesa contra o stresse oxidativo induzido por metais é o sistema antioxidante. Uma vez formados, os ROS necessitam de ser eliminados de modo a minimizar eventuais danos celulares (Moller, 2001). O termo antioxidante descreve qualquer composto capaz de anular estes agentes oxidantes sem subsequente formação de radicais mais tóxicos. Existem a nível celular respostas antioxidantes não enzimáticas compostas por várias moléculas como a glutathiona (GSH) e as tioredoxinas. Além das respostas antioxidantes não enzimáticas, existem igualmente respostas enzimáticas que incluem enzimas tais como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GPx) e a glutathiona redutase (GR) entre outras. Assim, compostos e enzimas antioxidantes actuam no sentido de reduzir níveis excessivos de ROS (Noctor e Foyer, 1998).

1.6.2 Mecanismos de resistência/tolerância

Os microrganismos têm de lidar com as elevadas concentrações de diferentes metais pesados nos diversos tipos de habitats. As bactérias são geralmente os organismos em maior número no solo com um número de células viáveis entre 10^6 e 10^9 (Lynch, 1988). Devido ao seu pequeno tamanho, as bactérias possuem uma elevada superfície em

relação ao seu volume e por esse motivo têm uma larga área de contacto que interage com o ambiente envolvente.

Os metais pesados têm de entrar para a célula para provocarem qualquer efeito fisiológico ou tóxico. Assim, tendo em conta que alguns destes elementos são necessários para os processos enzimáticos e para o crescimento bacteriano, a sua entrada na célula é facilitada pelos transportadores existentes (Nies, 1999). A maioria das células possui dois tipos de sistemas de absorção para metais pesados: um é constituído por sistemas rápidos e pouco específicos, são usados para uma variedade de iões e são expressos constitutivamente. Este tipo de sistemas, geralmente, é conduzido por um gradiente quimiosmótico através da membrana citoplasmática da bactéria; o outro tipo de transportadores têm especificidade elevada para o substrato, são lentos e utilizam ATP como fonte de energia, sendo muito dispendiosos do ponto de vista energético, motivo pelo qual só são expressos em situações desfavoráveis, ou seja são indutíveis (Nies e Silver, 1995). Quando a célula enfrenta concentrações altas de qualquer metal pesado, ocorre a absorção elevada destes iões através de sistemas de absorção pouco específicos, que se acumulam no citoplasma devido ao gradiente de concentração. Estes transportadores não são passíveis de serem fechados, sendo esta a principal razão pela qual os metais pesados entram nas células e exercem a sua toxicidade nos microrganismos (Nies e Silver, 1995). Contudo, a actividade biológica dos metais pesados pode ser marcadamente afectada pela presença de outros iões. Estudos realizados em *Escherichia coli* mostraram que a toxicidade do Ni, Co, Cd e Zn foi reduzida quando existia no meio grande quantidade de Mg, tendo o mesmo sido verificado para *Aerobacter aerogenes* em relação ao Co e ao Ni (Gadd e Griffiths, 1978).

Uma vez que a maioria dos metais pesados não podem ser degradados em compostos mais simples, os microrganismos desenvolveram vários mecanismos de tolerância/resistência (Figura 1.3) com o intuito de sobreviverem em locais contaminados por metais. Entre eles podemos distinguir: o transporte activo do ião metálico da célula para o exterior – sistemas de efluxo (Ji e Silver, 1995; Nies, 1992; Nies, 1995; Nies e Silver, 1995; Rensing et al., 1998; Silver e Phung, 1996; Silver e Ji, 1994), a sequestração intracelular por ligação a péptidos específicos e a ácidos orgânicos (Cook et al., 1998;

Purchase et al., 1997), a sequestração extracelular (Joho et al., 1995; Scott e Palmer, 1990) e a redução do íon metálico numa forma menos tóxica por acção enzimática (Ji e Silver, 1995; Misra, 1992). Os mecanismos de tolerância/resistência são muito diversificados, no entanto apenas se têm verificado num número limitado de espécies e o seu modo de actuação nem sempre é bem conhecido.

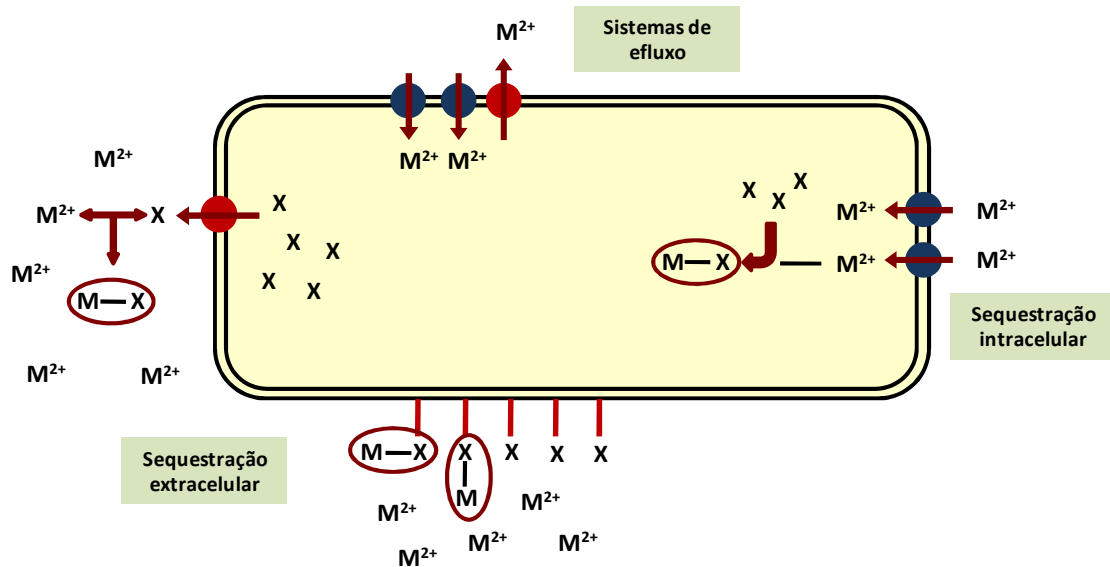


Figura 1.3 – Esquema representativo dos principais mecanismos de tolerância nas bactérias. M^{2+} - catião pesado; X- Constituintes da célula que interagem com os metais (adaptado de Haferburg e Kothe, 2007).

1.7 Objectivos gerais

Os trabalhos de mineração na Mina do Braçal decorreram durante mais de 100 anos e resultaram na contaminação dos solos adjacentes com elevadas concentrações de metais pesados, especialmente de chumbo. Assim, neste trabalho pretendeu-se:

- Caracterizar o local de amostragem determinando as propriedades físico-químicas e as concentrações de metais pesados dos solos e avaliar a influência dos metais pesados na actividade das enzimas do solo - Capítulo 2;

- Determinar a dimensão da população indígena de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* de cada um dos solos amostrados – Capítulo 3;

- Isolar estirpes de *Rhizobium* usando o trevo branco como planta armadilha hospedeira e verificar a sua autenticidade através da análise do gene *nodC* – Capítulo 3;

- Avaliar a eficácia de fixação de azoto dos isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* e relacionar com o grau de contaminação do local de origem - Capítulo 3;

- Caracterizar os diferentes isolados do ponto de vista de capacidade de produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal – Capítulo 3;

- Avaliar a diversidade das populações de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* de cada solo usando os perfis de plasmídeos, de REP e ERIC-PCR, de proteínas totais e de lipopolissacarídeos – Capítulo 4;

- Avaliar a tolerância dos isolados de rizóbio a vários metais pesados (Cu, Ni, Co, Cd, e Pb) e ao metalóide As - Capítulo 5;

- Estudar a sobrevivência ao longo do tempo (3, 6, 9 e 12 meses) de isolados de *Rhizobium* introduzidos em solos contaminados irradiados - Capítulo 6;

- Determinar os níveis de stress oxidativo provocado por exposições crescentes de cádmio e avaliar as respostas antioxidantes de alguns isolados de rizóbio - Capítulo 7.

Capítulo 2

Caracterização do local de amostragem e influência dos metais pesados nas enzimas do solo

2.1 Introdução

A acumulação excessiva de metais pesados nos solos é um efeito colateral do desenvolvimento humano tendo-se tornado objecto de grande preocupação para a comunidade científica nas últimas décadas. A concentração de metais nos solos está associada a complexos ciclos biológicos e geoquímicos e é influenciada por factores antropogénicos como as práticas agrícolas, o tratamento de lixos e as actividades industriais e mineiras (Çelo et al., 1999; Kabata-Pendias, 2004; Kabata-Pendias e Pendias, 2001; Valery e Eugene, 1998).

Em particular, a actividade mineira leva à degradação de solos naturais, uma vez que da extracção do minério resultam elevadas quantidades de resíduos potencialmente tóxicos, como é o caso dos metais pesados (Guo-Li et al., 2008; Vega et al., 2004). Consequentemente, os solos das minas possuem grandes limitações físico-químicas e biológicas, que dificultam a implementação de vegetação nestes locais, o que frequentemente leva a uma acidificação excessiva dos solos promovendo a contaminação ambiental (Vega et al., 2004). Os metais pesados quando em ambientes hiperacídicos e hiperoxidantes podem ser facilmente mobilizados através de águas de lixiviação contaminando as áreas subjacentes e os lençóis freáticos. Por outro lado, o facto dos solos das minas apresentarem uma fraca coesão, devido à instabilidade dos materiais

constituintes, promove processos de erosão pela água e pelo vento e consequente dispersão dos metais pesados para áreas circundantes.

A contaminação dos solos com metais é um sério problema para a manutenção da qualidade do solo (Chander et al., 2001) e esta é de máxima importância para os habitats naturais e agrícolas. A microbiologia do solo é um componente significativo da qualidade do mesmo uma vez que os microrganismos desempenham um papel vital na fertilidade e produção primária através da decomposição da matéria orgânica e dos ciclos de nutrientes (Oliveira e Pampulha, 2006).

As enzimas do solo desempenham estas funções e estão intimamente relacionadas com os ciclos de nutrientes (Bandick e Dick, 1999; Dick et al., 2000). Vários autores sugerem a actividade das enzimas do solo como indicadores atractivos para a monitorização do impacto de diversos poluentes, como os metais pesados, nas comunidades microbianas do solo (Dick, 1994; Dick, 1997; Giller et al., 1998; Top et al., 1999). Dado o elevado número de enzimas possíveis de determinar torna-se necessário fazer uma selecção de acordo com o objectivo do estudo. Os critérios de selecção devem estar relacionados com a importância das enzimas nos ciclos de nutrientes e na decomposição da matéria orgânica, a sensibilidade ao poluente e a rapidez, dificuldade e custo do método (Bandick e Dick, 1999).

Neste trabalho, o método da hidrólise do diacetato de fluorescina (HFDA) foi escolhido para estimar a actividade microbiana geral dos solos em estudo. O HFDA é considerado um método não específico uma vez que é sensível à actividade de várias classes de enzimas: lipases, esterases e proteases (Bandick e Dick, 1999; Hayano e Tubakai, 1985). A capacidade de hidrolisar o diacetato de fluorescina (FDA) é comum à maioria dos decompositores, bactérias e fungos. Geralmente, mais de 90% do fluxo de energia num solo está associado aos decompositores microbianos. Assim, um ensaio que meça a actividade microbiana decompositora pode providenciar uma boa estimativa da actividade microbiana total (Adam e Duncan, 2001; Bandick e Dick, 1999; Burns, 1982).

Foram também determinadas as actividades das enzimas desidrogenase (DHA), catalase (CAT), fosfatase ácida (FAC) e alcalina (FAL) e lipase (LIP).

As desidrogenases são um grupo de enzimas intracelulares que estão presentes nos microrganismos activos do solo (Gianfreda et al., 2005). Estas enzimas podem ser encontradas em todos os organismos vivos e fazem parte de muitas reacções metabólicas envolvidas na transferência oxidativa de energia nos microrganismos. A DHA não está activa como enzima extracelular no solo, assim a sua actividade também pode ser usada como um bom indicador da actividade microbiana geral e da capacidade dos microrganismos oxidarem a matéria orgânica (Bolton et al., 1985; Dick, 1997). Vários estudos demonstram que a actividade da DHA nos microrganismos é um dos parâmetros mais sensíveis para avaliar a toxicidade dos metais (Oliveira e Pampulha, 2006; Shen et al., 2005; Trasar-Cepeda et al., 2000).

A catalase é uma enzima intracelular encontrada em todas as bactérias aeróbias e na maioria das facultativas. Assim, a actividade da catalase é considerada um bom indicador da actividade microbiana aeróbia, estando relacionada com o número de microrganismos aeróbios e com a fertilidade do solo (Garcia e Hernández, 1997).

As fosfatases são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise do fosfato (Eivazi e Tabatabai, 1977) estando intimamente ligadas ao ciclo do fosfato. O fosfato inorgânico libertado desta acção é muito importante para as plantas e microrganismos (Sobolev e Begonia, 2008). Tendo em consideração o pH óptimo de actividade que varia entre 6,5 e 11, estas enzimas podem ser classificadas como fosfatase ácida ou fosfatase alcalina, respectivamente.

Em resultado da adição de emulsões de pesticidas e da contaminação por compostos orgânicos aromáticos os solos apresentam muitas vezes elevados níveis de lípidos sob a forma de triacilgliceróis que é a forma primária de armazenamento de gordura nas plantas e nos animais (Jaeger et al., 1994). As lipases são produzidas por uma larga variedade de microrganismos, plantas e animais e actuam nos triacilgliceróis quebrando as ligações éster entre os ácidos gordos e glicerol (Jaeger et al., 1994). Vários autores demonstraram a sua importância em solos com contaminação orgânica, especialmente na degradação de petróleo (Margesin et al., 1999). No entanto, a sua relação com a contaminação por metais pesados é ainda muito escassa.

Este capítulo teve como principais objectivos:

- Caracterizar o local de amostragem do ponto de vista das propriedades físico-químicas do solo com especial atenção para a concentração de metais pesados;
- Avaliar a influência dos metais pesados na actividade enzimática do solo;
- Compreender de que forma as enzimas do solo podem constituir bons indicadores de contaminação por metais pesados.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Caracterização do local de amostragem

2.2.1.1 Descrição do local

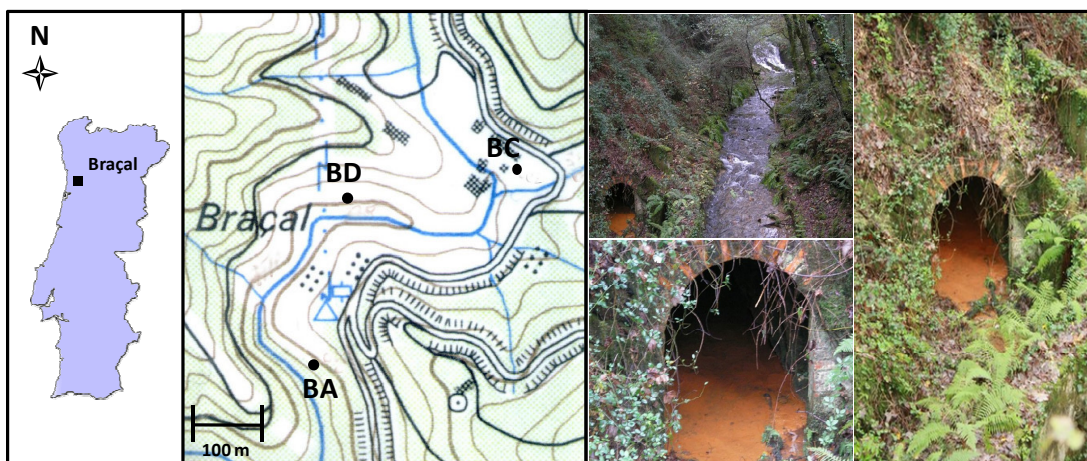


Figura 2.1 – Mapa de Portugal com a localização das minas do Braçal e enquadramento geral da zona de amostragem (Mina do Braçal).

O complexo mineiro do Braçal situa-se no noroeste de Portugal, no concelho de Sever do Vouga, distrito de Aveiro, nas margens do rio Mau (Figura 2.1).

Os trabalhos de mineração remontam à época dos romanos, os quais efectuaram importantes trabalhos de lavra de filões de chumbo e prata. No século XIX a exploração destes filões foi reactivada, tendo prosseguido até aos anos 70 do século XX (Rocha et al., 1996). O filão do Braçal não é uma estrutura contínua, estando relacionado com um acidente tectónico que terá colocado em contacto dois blocos com propriedades físicas distintas (Almeida, 1993). O filão do Braçal está assente em rocha encaixante muito fracturada (Xistos de Arada e Complexo Xisto-Grauváquico) e é constituído por fragmentos dessa rocha aglutinados por um cimento argilo-ferruginoso com pirite. A mineralização é constituída por galena (PbS), pirite (FeS₂) e calcite (CaCO₃), que se encontram dispersas na matriz argilosa, onde existe também quartzo brechificado. Contudo, a galena foi o minério explorado para chumbo por ser o mais abundante (Almeida, 1993; Rocha et al., 1996).

2.2.1.2 Colheita das amostras de solos

Em Outubro de 2005 foram recolhidas amostras compósitas de solos em diferentes locais da Mina do Braçal representativas da camada arável do solo (0-20 cm de profundidade) com a ajuda de uma pá de plástico previamente lavada e desinfectada com álcool. Dos 5 locais inicialmente escolhidos foram seleccionados apenas 3 (BC, BA e BD), tendo em consideração a contaminação e também o número de rizóbios presente. Os solos BD e BA foram recolhidos na zona central da mina, junto de um curso de água que inunda as galerias e encharca periodicamente os solos circundantes. O solo BC foi colhido numa zona periférica da mina tendo por isso servido como solo controlo (Figura 2.1). Após a colheita, os solos foram colocados em sacos plásticos e transportados para o laboratório onde foram armazenados a 4 °C em condições de escuridão.

2.2.1.3 Características físico-químicas dos solos

Foram analisadas 6-9 amostras representativas dos solos recolhidos na Mina do Braçal tendo-se procedido à determinação de diversos parâmetros físico-químicos. A determinação do pH, potencial redox, conteúdo em água, conteúdo em matéria orgânica e granulometria foi realizada no nosso laboratório (Universidade de Aveiro) tendo os restantes parâmetros sido analisados no Laboratório Rebelo da Silva.

Determinação do pH (em água): pesou-se 20 g de solo fresco de cada amostra e adicionou-se 50 ml de água destilada. A mistura foi agitada durante 10 min a 1000 rpm. Após repouso da amostra foi determinado o pH do sobrenadante com um medidor Orion modelo 290A.

Determinação do potencial redox (Eh): o potencial redox dos solos foi determinado através de um medidor Orion modelo 290A. O valor de potencial redox foi registado após um período de estabilização de 15 min.

Determinação do conteúdo em água: pesou-se 50 g de solo em placas de Petri e colocou-se numa estufa a 60 °C, até o peso se manter constante. As placas foram

colocadas num exsiccador até arrefecerem, tendo sido pesadas no final. O conteúdo em água foi determinado pela perda de peso a 60 °C e o seu valor expresso em percentagem.

Determinação do teor de matéria orgânica: pesou-se 2 g de solo previamente seco a 60 °C para cadinhos e colocaram-se os mesmos numa mufla a 500 °C durante 4 h. Seguidamente, os cadinhos foram retirados da mufla e colocados num exsiccador até arrefecerem, tendo sido posteriormente pesados. O teor de matéria orgânica foi calculado pela perda de peso entre as amostras secas (60 °C) e as amostras incineradas (500 °C) e o seu valor expresso em percentagem.

Granulometria: a análise granulométrica dos solos foi realizada de acordo com Quintino et al. (1989). Após uma lavagem com água destilada os solos foram sujeitos à acção de H₂O₂ de modo a destruir a matéria orgânica, tendo-se de seguida procedido à sua secagem a 110 °C até se obter um peso constante (P1). Posteriormente, realizou-se a dispersão química dos solos numa solução de pirofosfato tetra sódio (30 g l⁻¹) durante 24 h. Os solos húmidos foram crivados com o crivo de 63 µm. A porção de solo que ficou no crivo de 63 µm foi colocada a secar e o peso seco registado (P2). O peso seco da fracção <63 µm foi calculado através da diferença entre P1 e P2. A fracção correspondente a P2 foi colocada numa torre de crivos com as seguintes malhas: 2 mm, 1 mm, 500 µm, 250 µm, 125 µm e 63 µm. O tempo total de agitação foi de 10 min, sendo que os primeiros 5 min ocorreram a 20 rotações e os restantes 5 min a 40 rotações. Ao fim dos 10 min retiraram-se os crivos e pesou-se o solo presente em cada um deles.

Os solos foram classificados de acordo com a escala de Wentworth (Tabela 2.1) baseada no cálculo da mediana (Doeglas, 1968; Larssonneur, 1977).

Tabela 2.1 – Classificação dos solos adaptada da escala de Wentworth (Doeglas, 1968; Larssonneur, 1977).

ϕ	Classificação do solo	Conteúdo em finos (%)		
		< 5	5-25	25-50
[(-1) - 0[Areia muito grosseira			
[0 - 1[Areia grosseira			
[1 - 2[Areia Areia média	Limpo	Lodoso	Muito lodoso
[2 - 3[Areia fina			
[3 - 4[Areia muito fina			
> 4	Vasa		Acima 50%	

Determinação da concentração de metais pesados nos solos: os solos provenientes da Mina do Braçal foram secos a 60 °C e homogeneizados através de um crivo com malha de 1 mm. Pesou-se 2 g de solo e adicionaram-se 10 ml de HNO₃/HCl (3:1 v/v) seguindo-se a evaporação da solução a 120 °C. Este procedimento foi realizado duas vezes. Após a evaporação o resíduo foi diluído em 20 ml de HNO₃ a 0,1 N. Os extractos foram filtrados através de papel de filtro Whatman nº 42 e a determinação dos cationes pesados (Zn, As, Cu, Cr, Fe, Pb, Ni, Co e Cd) foi efectuada num espectrómetro ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy) modelo Jobin Yvon Jy plus.

2.2.2 Determinação da actividade de enzimas do solo

2.2.2.1 Hidrólise do diacetato de fluorescina (HFDA)

A determinação da hidrólise do diacetato de fluorescina foi realizada de acordo com o método descrito por Adam e Duncan (2001). Pesou-se 0,5 g de solo fresco, adicionaram-se 5 ml de 60 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,6 e homogeneizaram-se as amostras num vórtex durante 2 min. Adicionaram-se 25 µl de 4,8 mM de diacetato de fluorescina em acetona. As amostras foram incubadas durante 20 min a 25 °C com agitação (150 rpm). A reacção foi interrompida após a adição de 5 ml de acetona e as amostras foram centrifugadas a 8000 g durante 10 min à temperatura ambiente. A quantidade de

diacetato de fluorescina hidrolisada foi determinada a 490 nm usando padrões de fluorescina.

2.2.2.2 Actividade da Desidrogenase (DHA)

A actividade da desidrogenase nos solos foi determinada de acordo com Casida et al. (1964). Pesou-se 50 g de solo fresco e adicionaram-se 2 ml de 1% (m/v) de cloreto de trifeniltetrazólio e 2 ml de 1% (m/v) de glucose. A mistura foi incubada a 37 °C durante 24 h no escuro. Após incubação foram adicionados 10 ml de metanol de modo a extrair o trifenilformazan formado. Este procedimento foi realizado 4 vezes para garantir a total extracção do formazan. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 8000 g durante 10 min. A actividade da desidrogenase foi determinada a 485 nm usando padrões de trifenilformazan.

2.2.2.3 Actividade da Catalase (CAT)

A actividade da catalase nos solos foi determinada de acordo com o método descrito por Johansson e Borg (1988). Pesou-se 1 g de solo fresco e adicionaram-se 5 ml de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7) e 1,5 ml de metanol. As amostras foram incubadas durante 1 h a 25 °C com agitação (150 rpm). Seguidamente a reacção foi iniciada com 700 µl de 35,2 mM de H₂O₂, a mistura foi homogeneizada e colocada a incubar durante 20 min a 25 °C com agitação. Após a incubação a reacção foi terminada com a adição de 1,5 ml de 10 M de KOH e as amostras foram centrifugadas a 8000 g durante 10 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado para um novo tubo ao qual se adicionou 1 ml de 34,2 mM de Purpald iniciando-se a reacção cromogénica. Ao fim de 10 min adicionou-se 300 µl de 65,2 mM de periodato de potássio. A actividade da catalase nos diferentes solos foi determinada a 540 nm utilizando padrões de formaldeído.

2.2.2.4 Actividade das fosfatases ácida e alcalina (FAC/FAL)

A actividade das fosfatases ácida e alcalina nos solos foi determinada de acordo com Eivazi e Tabatabai (1977). Pesou-se 1 g de solo fresco e adicionou-se 4 ml de tampão

universal (100 mM de ácido cítrico, 100 mM de KH_2PO_4 , 100 mM de tetraborato de sódio. $10\text{H}_2\text{O}$, 100 mM de Tris, 100 mM de KCl, pH 6,5 ou pH 11 consoante a determinação da fosfatase ácida ou alcalina, respectivamente). Em seguida, adicionou-se 1 ml de *p*-nitrofenil fosfato disódico e incubaram-se as amostras durante 40 min a 37 °C. Após a incubação adicionou-se 1 ml de 0,5 M CaCl_2 e 1 ml de 0,5 M de NaOH e centrifugaram-se as amostras a 8000 g durante 10 min à temperatura ambiente. A actividade das fosfatases ácida e alcalina foi determinada a 420 nm usando padrões de *p*-nitrofenol.

2.2.2.5 Actividade da Lipase (LIP)

A actividade da lipase foi determinada de acordo com Margesin et al. (2002). Pesou-se 0,1 g de solo fresco e adicionou-se 5 ml de 100 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,25 previamente aquecido a 30 °C. Em seguida, adicionou-se 50 µl de butirato de *p*-nitrofenol (substrato) diluído em 2-propanol e procedeu-se à homogeneização da mistura e posterior incubação durante 10 min a 30 °C. A reacção foi terminada colocando as amostras em gelo durante 10 min. As amostras foram centrifugadas a 8000 g durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante retirado para um novo tubo. A actividade da lipase foi determinada a 400 nm utilizando padrões de *p*-nitrofenol.

2.2.3 Análise estatística

As diferenças significativas entre os solos amostrados em relação aos parâmetros físico-químicos, à concentração de metais e às actividades das enzimas do solo foram determinadas através da análise de variâncias - ANOVA unifactorial com aplicação do teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando o programa SigmaStat 3.5. Também foram realizadas correlações de Pearson entre os diversos parâmetros físico-químicos e a concentração total de metais, entre a actividade das enzimas do solo e as concentrações de metais e entre as actividades das diferentes enzimas.

2.3 Resultados

2.3.1 Parâmetros físico-químicos dos solos

Tabela 2.2 – Parâmetros físico-químicos determinados nos solos BC, BD e BA da mina do Braçal. SBT – soma das bases de troca; CTC- capacidade de troca catiónica.

	BC	BD	BA
pH (em H ₂ O)	5,08	5,21	4,15
Potencial redox (mV)	127,67	121,67	123,33
Matéria orgânica (LOI%)	9,35	10,81	4,72
Conteúdo em água (%)	16,44	24,15	7,86
Granulometria	Areia muito grosseira	Areia grosseira	Areia muito grosseira
% Finos (< 63 µm)	5,20	1,90	0,45
P ₂ O ₅ (mg kg ⁻¹)	131	15	7
K ₂ O (mg kg ⁻¹)	345	141	38
Magnésio (mg kg ⁻¹)	80	76	20
Ferro (g kg ⁻¹)	44	66	48
Manganês (mg kg ⁻¹)	325	290	175
N total (%)	0,38	0,27	0,14
C total (%)	5,20	6,00	2,62
C/N	13,72	22,16	18,89
Cloretos (mg kg ⁻¹)	n.d.	n.d.	n.d.
Sulfatos - SO ₄ (mg kg ⁻¹)	0,11	0,38	0,67
Bases Troca			
Ca (me 100 g ⁻¹ - % saturação)	4,10 - 46,6	3,53 - 50,4	0,82 - 18,3
Mg (me 100 g ⁻¹ - % saturação)	0,83 - 9,4	0,80 - 11,4	0,23 - 5,1
K (me 100 g ⁻¹ - % saturação)	0,82 - 9,3	0,36 - 5,1	0,08 - 1,8
Na (me 100 g ⁻¹ - % saturação)	0,35 - 3,9	0,31 - 4,4	0,14 - 3,1
SBT (me 100 g ⁻¹ - % saturação)	6,09 - 69,3	5,00 - 71,4	1,27 - 28,4
Acidez troca (me 100 g ⁻¹ - % saturação)	2,70 - 30,7	2,00 - 28,6	3,20 - 71,6
CTC (me 100 g ⁻¹)	8,79	7,00	4,47
Condutividade eléctrica (mS cm ⁻¹)	0,42	0,17	0,17

Na Tabela 2.2 estão apresentados alguns dos parâmetros físico-químicos determinados nos solos amostrados (BC, BD e BA). Todos os solos apresentaram um pH inferior a 5,5, sendo o solo BA o mais ácido (4,15). Em relação ao potencial redox não se verificaram diferenças significativas entre os solos ($P > 0,05$). No entanto, o conteúdo em matéria orgânica variou significativamente ($P < 0,05$). Nos solos BC e BD verificaram-se valores muito similares ($\approx 10\%$ LOI) enquanto que no solo BA o conteúdo em matéria orgânica foi menor (4,72%). O conteúdo em água também variou significativamente ($P < 0,05$) entre os diferentes solos sendo mais elevado no solo BD (24,15%). Relativamente ao tamanho das partículas do solo (granulometria), os solos BC e BA foram classificados como areia muito grosseira, enquanto o solo BD foi classificado como areia grosseira. A fracção $< 63 \mu\text{m}$ variou entre os diferentes locais, tendo ultrapassado os 5% no solo BC, enquanto no solo BA foi muito reduzida (0,45%).

O conteúdo em P_2O_5 registado no solo BC (131 mg kg^{-1}) foi significativamente superior ($P < 0,05$) aos valores observados nos solos BD e BA (15 e 7 mg kg^{-1} , respectivamente), tendo-se verificado o mesmo para a concentração de K_2O . Relativamente às concentrações de magnésio e manganês verificou-se que o solo BA possui valores muito inferiores aos encontrados em BC e BD ($P < 0,05$). A concentração de ferro foi muito similar entre os solos BC e BA ($\approx 45 \text{ g kg}^{-1}$) enquanto no solo BD (66 g kg^{-1}) foi mais elevada.

A percentagem de N total foi semelhante nos solos BC e BD (0,38 e 0,27%, respectivamente) e inferior no solo BA (0,14%), tendo-se verificado a mesma tendência para o C total.

A capacidade de troca catiónica (CTC) foi determinada com o objectivo de estimar a capacidade de retenção de nutrientes de cada solo. Assim, verificou-se que a CTC foi mais elevada nos solos BC e BD ($8,79 \text{ me } 100 \text{ g}^{-1}$ e $7,00 \text{ me } 100 \text{ g}^{-1}$, respectivamente). A soma das bases de troca (STB) indica a percentagem de locais de troca totais que estão ocupados pelos catiões básicos, tendo sido cerca de 70% nos solos BC e BD e de apenas 28% no solo BA. O cálcio, apresentou uma percentagem de saturação próxima do 50% nos solos BC e BD e apenas de 18% no solo BA. No solo BA determinou-se uma

percentagem de saturação de catiões ácidos (71%) muito mais elevada que os outros dois solos.

Tabela 2.3 - Correlações de Pearson entre diferentes parâmetros físico-químicos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

	pH	Matéria orgânica	Conteúdo em água	Potencial redox	Total de metais
pH	1				
Matéria orgânica	0,842**	1			
Conteúdo em água	0,923***	0,804**	1		
Potencial redox	0,120	-0,280	-0,030	1	
Total metais	-0,700*	-0,536*	-0,428	-0,080	1

Na Tabela 2.3 podemos observar os coeficientes de correlação entre os diferentes parâmetros físico-químicos e a concentração total de metais pesados. A matéria orgânica está correlacionada positivamente ($r=0,842$, $P < 0,01$) com o pH dos solos. Também foram observadas correlações fortes e positivas entre o pH e o conteúdo em água ($r=0,923$, $P < 0,001$) e entre a matéria orgânica e o conteúdo em água ($r=0,804$, $P < 0,01$). Não se registaram correlações significativas entre o potencial redox e os restantes parâmetros. Relativamente à concentração total de metais pesados verificou-se que este parâmetro se correlacionou negativamente com o pH ($r=-0,700$, $P < 0,05$) e com o conteúdo em matéria orgânica ($r=-0,536$, $P < 0,05$), não tendo apresentando correlações significativas com os restantes parâmetros estudados.

2.3.2 Concentração de metais pesados e do metalóide arsénio nos solos

Tabela 2.4 – Concentração total de metais pesados e do metalóide As (mg kg^{-1} solo seco) nos diferentes solos amostrados (BC, BD e BA). Os dados são médias \pm desvio padrão de 6 réplicas. Para o mesmo metal letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$). * Concentrações máximas (mg kg^{-1} de solo seco) de metais pesados permitidas nos solos agrícolas tratados com lamas residuais (D.R., Série I-A, Decreto Lei nº 118 de 21 de Junho de 2006).

Metais (mg kg^{-1})	BC	BD	BA	*Conc. Máx pH <5,5
As	$24,1 \pm 5,0^a$	$53,7 \pm 7,4^b$	$84,7 \pm 6,2^c$	-
Cd	$1,6 \pm 0,2^a$	$3,9 \pm 0,4^b$	$3,9 \pm 0,2^b$	1
Pb	$211,6 \pm 16,1^a$	$8879,8 \pm 755,2^b$	$15411,5 \pm 2471,7^c$	50
Cr	$45,0 \pm 5,2^a$	$40,8 \pm 4,4^a$	$23,7 \pm 0,4^b$	50
Zn	$67,4 \pm 4,8^a$	$654,3 \pm 46,4^b$	$428,5 \pm 40,8^c$	150
Co	$10,8 \pm 0,5^a$	$10,3 \pm 1,3^a$	$4,2 \pm 0,2^b$	-
Ni	$12,9 \pm 1,8^a$	$34,8 \pm 3,5^b$	$16,0 \pm 0,2^a$	30
Cu	$35,2 \pm 4,3^a$	$124,0 \pm 11,7^b$	$205,1 \pm 14,2^c$	50
Total metais	$408,6 \pm 36,9^a$	$9801,8 \pm 826,6^b$	$16177,7 \pm 2489,9^c$	-

As concentrações totais de metais pesados nos diferentes solos amostrados variaram significativamente ($P < 0,05$). Observando a Tabela 2.4 é possível afirmar que solo BC é o solo com menor concentração de metais e por esse motivo foi considerado o solo controlo. A soma das concentrações dos 8 metais analisados foi 24 vezes superiores no solo BD e 40 vezes mais elevada em BA do que no solo BC. Relativamente aos metais não essenciais Cd e Pb verificou-se que as suas concentrações nos solos ultrapassaram largamente os limites impostos pelo Decreto Lei nº 118/06, especialmente em BD e BA. As concentrações de chumbo foram extremamente elevadas em todos os solos, especialmente nos solos BD e BA. Em relação aos metais essenciais verificou-se que apenas para o Zn e para o Cu foram excedidas as concentrações limite nos solos mais contaminados (BD e BA).

2.3.3 Enzimas dos solos

Na Figura 2.2 podemos observar a hidrólise do diacetato de fluorescina nos diferentes solos. Os valores de HFDA obtidos para o solo BC foram semelhantes aos obtidos para os solos mais contaminados (BD e BA) não se tendo verificado diferenças significativas ($P > 0,05$).

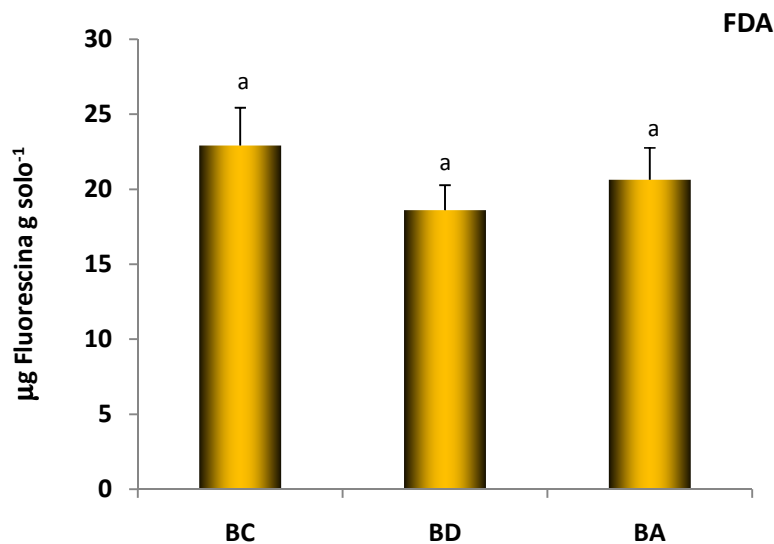


Figura 2.2 – Hidrólise do diacetato de fluorescina (μg fluorescina g solo^{-1} fresco) determinada após um período de 20 min nos solos BC, BD e BA da mina do Braçal. Os dados são médias \pm erro padrão de 30-40 réplicas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$).

Na Figura 2.3 podemos observar a actividade da enzima desidrogenase nos diferentes solos amostrados. Verificaram-se diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os diferentes solos. No solo BC a actividade da DHA foi mais elevada enquanto os solos BD e BA apresentaram valores similares entre si e significativamente ($P < 0,05$) mais baixos.

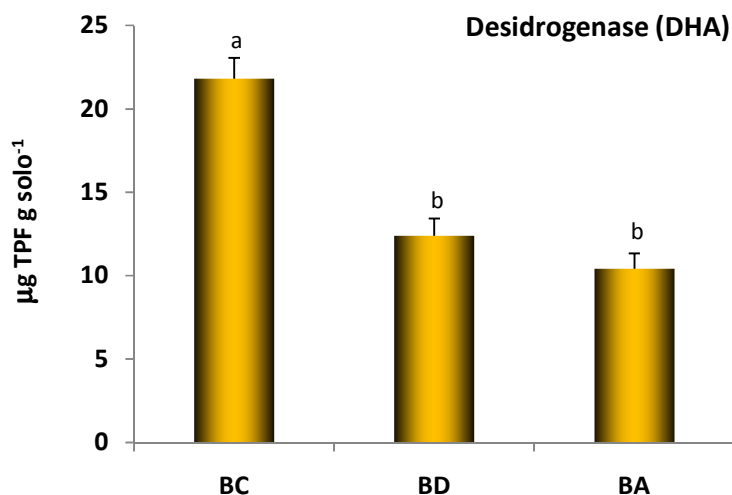


Figura 2.3 – Actividade da desidrogenase ($\mu\text{g TPF g solo}^{-1}$ fresco) determinada após um período de 24 h nos solos BC, BD e BA da mina do Braçal. Os dados são médias \pm erro padrão de 30-40 réplicas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$).

A actividade da catalase nos diferentes solos da mina do Braçal está representada na Figura 2.4. A actividade desta enzima foi significativamente diferente entre os solos estudados ($P < 0,05$). O solo BC foi o solo onde se registou maior actividade. Os solos BD e BA apresentaram valores significativamente ($P < 0,05$) mais baixos e similares entre si.

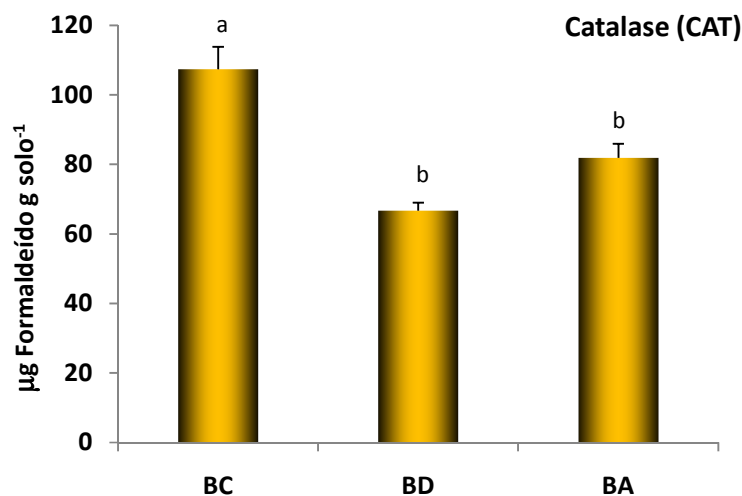


Figura 2.4 – Actividade da catalase ($\mu\text{M Formaldeído g solo}^{-1}$ fresco) determinada após um período de 1 h nos solos BC, BD e BA da mina do Braçal. Os dados são médias \pm erro padrão de 30-40 réplicas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$).

A actividade da fosfatase ácida nos diferentes solos está apresentada na Figura 2.5. A actividade desta enzima foi significativamente ($P < 0,05$) mais elevada nos solos contaminados, especialmente no solo BA. A actividade da fosfatase alcalina foi nula em todos os solos estudados.

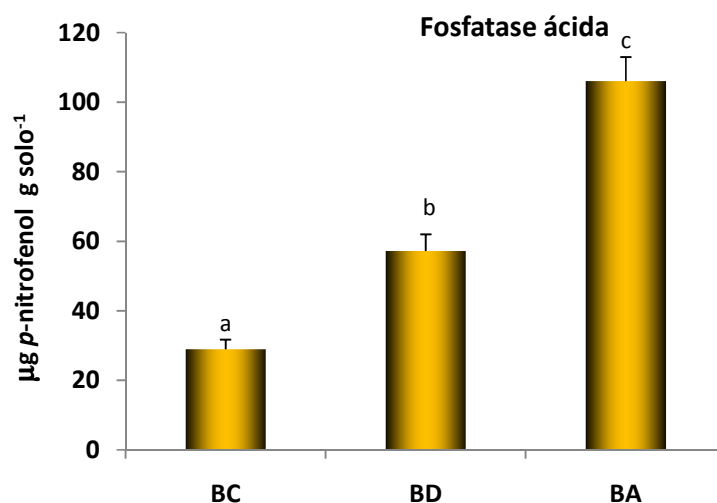


Figura 2.5 – Actividade da fosfatase ácida ($\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g solo}^{-1}$ fresco) determinada após um período de 40 min nos solos BC, BD e BA da mina do Braçal. Os dados são médias \pm erro padrão de 30-40 réplicas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$).

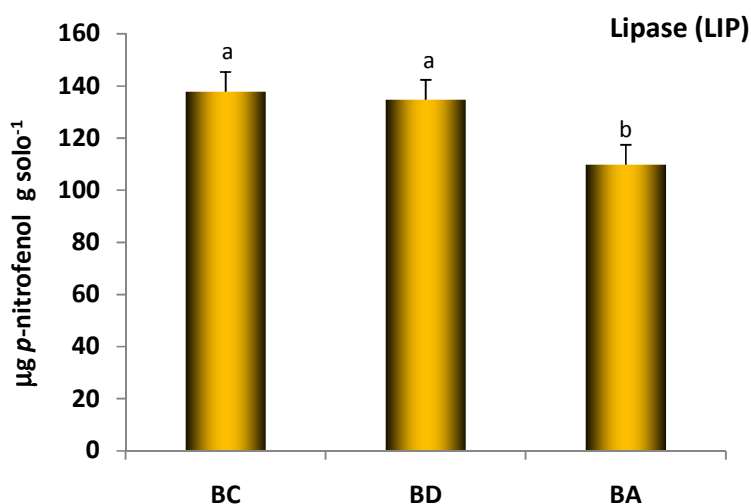


Figura 2.6 – Actividade da lipase ($\mu\text{g } p\text{-nitrofenol g solo}^{-1}$ fresco) determinada após um período de 10 min nos solos BC, BD e BA da mina do Braçal. Os dados são médias \pm erro padrão de 30-40 réplicas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$).

Relativamente à actividade da lipase (Figura 2.6) não se verificaram diferenças significativas entre os solos BC e BD ($P > 0,05$), no entanto no solo BA a actividade desta enzima foi significativamente ($P < 0,05$) mais baixa.

Tabela 2.5 – Correlações de Pearson entre a actividade das diferentes enzimas e a concentração total de cada metal e do metalóide As presente nos solos das minas do Braçal e entre a actividade das enzimas e o pH e matéria orgânica (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

	HFDA	DHA	CAT	FAC	LIP
As	-0,366	-0,895***	-0,642*	0,970***	-0,659*
Pb	-0,522	-0,940***	-0,712**	0,958***	-0,709*
Cd	-0,623*	-0,919***	-0,923*	0,763**	-0,359
Zn	-0,603*	-0,781**	-0,985***	0,477	-0,055
Co	0,091	0,685*	0,276	-0,932***	0,817***
Ni	-0,528	-0,383	-0,795**	-0,021	0,409
Cr	0,096	0,749*	0,371	-0,930***	0,870**
Cu	-0,442	-0,932***	-0,688*	0,976***	-0,709*
pH	0,067	0,570	0,094	-0,858**	0,873**
Matéria orgânica	-0,270	0,361	-0,027	-0,704*	0,676*

A actividade das enzimas do solo pode ser afectada pelas concentrações de metais pesados. Na Tabela 2.5 podemos observar as correlações existentes entre as actividades das diferentes enzimas estudadas e as concentrações do metalóide As e dos restantes metais (Pb, Cd, Zn, Co, Ni, Cr, Cu) assim como com o pH e a matéria orgânica. De um modo geral, o arsénio e os metais não essenciais (Cd e Pb) correlacionaram-se negativamente com a DHA, CAT e LIP e positivamente com a FAC, verificando-se a mesma tendência para o Zn e Cu. O crómio apresentou uma forte correlação positiva com a enzima DHA e uma correlação negativa com a FAC. Em relação ao FDA não se verificaram correlações significativas com a maioria dos metais, com excepção do Cd e Zn. O pH e a

matéria orgânica correlacionaram-se negativamente com a actividade da FAC e de forma positiva com a actividade da LIP.

Tabela 2.6 – Correlações de Pearson entre as actividades das diferentes enzimas determinadas nos solos das minas do Braçal (*P< 0,05; **P< 0,01; ***P< 0,001).

	HFDA	DHA	CAT	FAC	LIP
HFDA	1				
DHA	0,598*	1			
CAT	0,625*	0,854**	1		
FAC	-0,312	-0,878**	-0,551	1	
LIP	0,278	0,643*	0,176	-0,798**	1

As actividades das diferentes enzimas do solo estão muitas vezes relacionadas entre si. Na Tabela 2.6 podemos observar os coeficientes de correlação calculados para cada par de enzimas. Assim, podemos afirmar que a HFDA se correlacionou positivamente com a DHA ($r=0,598$, $P< 0,05$) e com a CAT ($r=0,625$, $P< 0,05$), não apresentando correlações significativas com a FCA e LIP. A DHA correlacionou-se positivamente com a CAT ($r=0,854$, $P< 0,05$) e com a LIP ($r=0,642$, $P< 0,05$) enquanto com a fosfatase alcalina a correlação foi fortemente negativa ($r=-0,878$, $P< 0,01$). Entre as restantes enzimas as correlações não foram significativas, com excepção da LIP e FAC que se correlacionam negativamente ($r=-0,798$, $P< 0,01$).

2.4 Discussão

2.4.1 Características físico-químicas dos solos

Os solos amostrados na Mina do Braçal apresentaram valores de pH bastante baixos, que variaram entre 4,15 e 5,21 (Tabela 2.2). A acidificação dos solos das minas é muito frequente e deriva de um processo designado por drenagem ácida que ocorre em resultado da oxidação das pirites (Alloway, 1995b; Evangelou e Zhang, 1995; Haferburg e Knothe, 2007; Michelutti e Wiseman, 1995). O facto dos solos em estudo possuírem pH ácido sugere uma maior biodisponibilidade dos metais pesados para os microrganismos. Vários autores mostraram que a acidificação dos solos pode influenciar a capacidade de absorção dos metais pelos microrganismos e plantas uma vez que os elementos traço estão mais biodisponíveis em condições ácidas e a sua mobilidade decresce à medida que o pH se aproxima da neutralidade (Alloway, 1995b; Chaudri et al., 2000; Xu et al., 2007).

O conteúdo em matéria orgânica é também um componente importante na manutenção da fertilidade e qualidade do solo. Este é muito inconstante, podendo variar entre 0,1% em solos áridos e 100% em solos orgânicos e está dependente das práticas agrícolas e do clima (Stevenson, 1994; Zdruli et al., 2004). Zdruli et al. (2004) estimaram que 74% dos solos da Europa do Sul possuem menos de 3,4% de matéria orgânica na camada cultivável (0-30 cm). O conteúdo de matéria orgânica nos solos da Mina do Braçal variou entre um mínimo de 4,72% em BA e um máximo de 10,81% em BD (Tabela 2.2). Pereira et al. (2006c) registaram valores similares de matéria orgânica nos solos da mina de São Domingos no Alentejo. O conteúdo em matéria orgânica pode estar relacionado com outras propriedades físico-químicas, como é o caso do pH. Segundo Primavesi (1984) os solos ácidos geralmente apresentam um baixo teor em matéria orgânica uma vez que a deposição de biomassa é reduzida. Este facto foi comprovado pela correlação positiva ($r=0,842$, $P<0,01$) entre o pH e o conteúdo em matéria orgânica (Tabela 2.3) verificada nos solos da mina do Braçal. Os solos BC e BD apresentaram um pH ligeiramente mais elevado do que o solo BA tendo o mesmo sucedido para o conteúdo em matéria orgânica (Tabela 2.2). Do ponto de vista biológico, uma elevada percentagem de matéria orgânica melhora a actividade microbiana do solo e permite a formação de complexos com metais

pesados e alguns pesticidas podendo afectar a biodisponibilidade destes contaminantes (Brady e Weil, 1996; McBride, 1994; Xu et al., 2007). O solo BA apresentou um conteúdo em matéria orgânica baixo (Tabela 2.2) em relação aos restantes solos, sugerindo uma maior biodisponibilidade dos metais neste solo. Por outro lado, a fracção <63 μm , na qual se incluem as argilas, também foi bastante reduzida neste solo (0,45%), o que também contribui para o aumento da biodisponibilidade dos metais. Segundo Otte et al. (1991) os metais ligam-se às partículas de tamanho <63 μm ficando menos disponíveis para serem absorvidos.

Geralmente, o conteúdo em matéria orgânica está correlacionado positivamente com o conteúdo em argilas de um solo. Este aspecto está dependente de dois mecanismos: 1) as ligações entre as partículas argilosas e a matéria orgânica retardam o processo de decomposição da matéria orgânica; 2) os solos com maior conteúdo em argilas formam macroagregados com maior facilidade, protegendo a matéria orgânica da mineralização por parte dos microrganismos (Rice, 2002). De facto, neste trabalho verificou-se que o solo com menor conteúdo em matéria orgânica (BA) também possui menor percentagem de partículas de tamanho inferior a 63 μm (Tabela 2.2).

Por capacidade de troca catiónica (CTC) de um solo entende-se a reacção de troca entre quantidades equivalentes de catiões adsorvidos nas partículas coloidais do solo e os catiões em solução na água do solo. A capacidade de troca catiónica está intimamente relacionada com o conteúdo em matéria orgânica do solo (Smolders et al., 2009). Crovetto (1997) mostrou um aumento de 136% na CTC como consequência do aumento de húmus na camada superficial do solo após 20 anos de retenção de resíduos. A CTC tem um significado prático grande, visto que a troca de catiões vai influenciar a quantidade de nutrientes disponíveis para as plantas e microrganismos e a sua possível retenção no solo (Varennnes, 2003), assim como a biodisponibilidade dos metais pesados (Giller et al., 2009; Smolders et al., 2009). Quanto maior for o valor de CTC mais catiões o solo consegue reter. De acordo com Doelman e Haanstra (1979) e Smolders et al. (2009) nos solos com elevada CTC as comunidades microbianas são pouco ou nada afectadas pela adição de metais enquanto nos solos com baixa CTC observa-se uma redução da actividade microbiana devido à acção dos metais. No presente trabalho, a CTC foi muito baixa nos

solos contaminados com valores de 4,47 e 7,0 me 100 g⁻¹ nos solos BA e BD, respectivamente (Tabela 2.2), o que torna estes solos ainda mais sensíveis aos metais pesados. Os catiões de troca (Ca, Mg, K e Na) uma vez na solução do solo podem ser absorvidos pelas plantas. O catião de troca que ocorre em maior abundância nos solos estudados é o Ca, seguido do Mg (Tabela 2.2). A soma das bases de troca (STB) revelou que a maioria dos catiões presentes nos solos BC e BD são básicos uma vez que a percentagem de saturação atingiu os 70% nestes solos. Por outro lado, o solo BA registou um STB de 28% sendo que a percentagem de saturação do Ca foi muito baixa e a quantidade de catiões ácidos foi elevada, já que a acidez de troca foi próxima dos 72%. De acordo com Smolders et al. (2009) quanto mais ácido for o solo mais próximo está o valor da acidez de troca da CTC. Este facto foi confirmado para o solo BA, cujo valor de acidez de troca foi de 3,2 e para a CTC obteve-se o valor 4,47 (Tabela 2.2).

A concentração de metais pesados nos diferentes solos foi bastante elevada e variou significativamente ($P < 0,05$). O solo BC apresentou uma concentração total de metais muito inferior à registada nos restantes solos (BD e BA). Este resultado era esperado uma vez que o solo BC foi recolhido da periferia da mina e considerado o solo controlo neste estudo. Os solos BD e BA são solos com elevada contaminação sendo que no solo BD se registaram níveis de contaminação intermédios em comparação com o solo BA que apresentou concentrações muito elevadas de metais pesados (Tabela 2.4). As diferenças de contaminação entre os locais estão relacionadas com a sua localização na mina do Braçal (Figura 2.1). O solo BC foi recolhido na zona periférica da mina e por esse motivo esteve menos exposto à contaminação resultante da actividade mineira. Os solos BD e BA encontram-se localizados no centro da mina na zona onde decorreu maior actividade, estando muito próximos de um curso de água que inunda as galerias (Figura 2.1) transportando para o seu exterior grandes quantidades de metais que depois tendem a ficar depositados nos solos adjacentes. As concentrações de Cd e Pb analisadas nos solos BD e BA ultrapassaram largamente os limites impostos pelo Decreto de Lei nº 118 de 21 de Junho de 2006. As concentrações de Pb foram especialmente altas uma vez que o minério extraído nesta mina era rico em chumbo. As concentrações de As também foram elevadas nestes solos, embora o Decreto de Lei anteriormente referido não

apresente limites para este metalóide. No entanto, de acordo com Tamaki e Frankenberger (1992) a concentração média de As nos solos de todo o mundo é de 6 mg kg^{-1} , podendo variar entre 0,1 e 40 mg kg^{-1} . As concentrações registadas deste elemento nos solos BD e BA foram de 53,7 e $84,7 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente, estando deste modo bastante acima dos valores encontrados na maioria dos solos a nível mundial. Ghosh et al. (2004) registaram valores de As total que variaram entre 11,2 e $36,1 \text{ mg kg}^{-1}$ em solos da Baía de Bengala que sofreram uma forte contaminação com este elemento. Relativamente aos metais não essenciais verificou-se que as suas concentrações também ultrapassaram os limites definidos por lei nos solos mais contaminados (BD e BA), com a excepção do Cr e Cu cujas concentrações estão muito próximas do limite mas não o ultrapassam. A existência de outros metais além do Pb em elevadas concentrações nos solos em estudo era esperada uma vez que a extracção do minério resulta numa contaminação múltipla que afecta a qualidade do solo (Dudka e Adriano, 1997).

A laboração da mina do Braçal cessou nos anos 70, no entanto na actualidade as concentrações de metais pesados nos solos estão muito acima dos limites impostos por lei, o que confirma o elevado tempo de permanência destes elementos nos solos. As concentrações de metais pesados nos solos da mina do Braçal são muito mais elevadas do que as determinadas nos solos de outras minas do país, como é o caso da mina de São Domingos (Pereira et al., 2006c) que está situada no Alentejo numa das províncias mais metalogénicas da Europa (Webb, 1958).

2.4.2 Influência da contaminação por metais na actividade enzimática do solo

As propriedades físico-químicas têm vindo a ser usadas como medida da qualidade do solo (Parr e Papendick, 1997). No entanto, estas propriedades têm um peso menor na avaliação da sua qualidade, uma vez que só se alteram quando o solo é sujeito a mudanças drásticas, sendo por isso pouco sensíveis (Filip, 2002). Por outro lado, as propriedades biológicas e bioquímicas são mais sensíveis a pequenas alterações nos solos, sejam estas de origem natural ou de origem antropogénica como é o caso da contaminação por metais pesados (Hinojosa et al., 2004a; Klein et al., 1985; Nannipieri et

al., 1990; Pascual et al., 2000; Yakovchenko et al., 1996). Assim, a actividade das enzimas do solo tem sido proposta como um bom indicador da qualidade do mesmo, uma vez que estimam a actividade microbiana do solo, estando intimamente relacionadas com os ciclos de nutrientes e são de fácil determinação (Calderon et al., 2000; Drijber et al., 2000; Gianfreda e Bollag, 1996; Nannipieri et al., 2002).

Com o ensaio do HFDA pretendeu-se obter uma estimativa geral da actividade microbiana dos solos. As células transportam o diacetato de fluorescina para o seu interior e hidrolisam-no em fluorescina. Quando a capacidade de armazenamento é atingida esta substância é libertada para o exterior (Ghosh et al., 2004). Neste trabalho não se registaram diferenças significativas entre os solos amostrados ($P > 0,05$), indicando que a contaminação por metais pesados não influenciou a actividade das enzimas que hidrolisam o diacetato de fluorescina. Este facto foi comprovado pela inexistência de correlação significativa entre a HFDA e as concentrações da maioria dos metais pesados (Tabela 2.5), com excepção do Cd e do Zn para os quais se verificaram fracas correlações negativas ($r = -0,623$ e $r = -0,603$, respectivamente). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os verificados por Gianfreda et al. (2005) onde as concentrações dos diferentes metais pesados não influenciaram a HFDA, com excepção do Cu.

Vários autores indicam a actividade da DHA como um dos parâmetros mais sensíveis para avaliar a toxicidade dos metais pesados na microflora do solo (Achuba e Clarke, 2008; Ghorbani et al., 2002; Irha et al., 2003; Machulla, 2003; Margesin et al., 2000; Moreno et al., 2002; Nannipieri et al., 1990; Obbard, 2001; Rossel e Tarradells, 1991). A actividade da DHA variou significativamente ($P < 0,05$) entre o solo controlo e os solos contaminados BD e BA. A actividade da DHA no solo BC foi duas vezes superior à actividade registada nos solos contaminados (Figura 2.4). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por vários autores que mostraram menor actividade desta enzima nos solos contaminados com metais (Kizilkaya et al., 2004; Lee et al., 2002; Mikanova, 2006; Oliveira e Pampulha, 2006; Trasar-Cepeda et al., 2000). Adicionalmente, verificou-se uma forte correlação negativa ($r = -0,895$, $P < 0,001$) entre a actividade da DHA e a concentração total de As (Tabela 2.5). Resultados similares foram obtidos por Fernández et al. (2005) em solos de uma mina de prata localizada no México e por Ghosh et al.

(2004) em solos muito contaminados com As. Nos solos da mina do Braçal a actividade da DHA também foi fortemente afectada por outros metais como o Pb ($r=-0,940$, $P< 0,001$), o Cd ($r=-0,919$, $P< 0,001$) e o Cu ($r=-0,932$, $P< 0,001$) como demonstraram as correlações obtidas (Tabela 2.5). Vários autores também mostraram a forte inibição da actividade da DHA em solos contaminados com Pb (Akmal e Jianming, 2008; Belyaeva et al., 2005; Marzadori et al., 1996; Pereira et al., 2006c). Estudos em laboratório demonstraram uma redução na actividade desta enzima após a adição de 50 mg Cd kg^{-1} (Dar, 1996). Adicionalmente, Chander e Brookes (1991) e Kizilkaya et al. (2004) demonstraram que a presença de Cu nos solos inibe a actividade da DHA.

A actividade da CAT também variou significativamente ($P< 0,05$) entre os solos amostrados. No solo BC a actividade desta enzima foi cerca de 1,5 vezes superior à verificada nos solos BD e BA (Figura 2.4), sugerindo a influência da contaminação por metais pesados na sua actividade. Estes resultados foram confirmados pelas correlações obtidas entre a CAT e os diferentes metais pesados (Tabela 2.5). De facto, os metais pesados podem reduzir a actividade enzimática interferindo com o complexo enzima-substrato, desnaturando a proteína e interagindo com os grupos activos da enzima (Nannipieri, 1994). Neste trabalho, a actividade da CAT está correlacionada negativamente com praticamente todos os metais analisados (Tabela 2.5), indiciando um efeito nefasto destes elementos na CAT. Segundo Belayaeva et al. (2005) o Pb, Zn e Cu influenciam negativamente a actividade da CAT e de acordo com Kizilkaya et al. (2004) e Stępniewska et al. (2009) a actividade desta enzima é reduzida em solos contaminados com metais pesados. O efeito negativo dos metais na CAT foi muito semelhante ao observado na actividade da DHA. Este facto é corroborado pelas correlações negativas obtidas entre as actividades das duas enzimas e os diferentes metais pesados (Tabela 2.5).

Segundo Margesin et al. (2000) as actividades das enzimas do solo podem correlacionar-se entre si. A DHA e a CAT estão ambas envolvidas no metabolismo intracelular e por esse motivo estão relacionadas. Tal facto foi corroborado pela correlação positiva entre a actividade da DHA e a da CAT ($r=0,854$, $P< 0,01$) obtida neste trabalho. Nos solos em estudo, a HFDA também se correlacionou positivamente com a

CAT ($r=0,625$, $P<0,05$) e DHA ($r=0,598$, $P<0,05$) (Tabela 2.6). Embora todas estas enzimas estejam relacionadas com a actividade microbiana total dos solos, as enzimas envolvidas na hidrólise do diacetato de fluorescina funcionam extracelularmente. Por outro lado, formam complexos estáveis com as argilas e matéria orgânica dos solos, sendo por isso mais resistentes ao impacto ambiental que outras enzimas como a CAT e DHA, justificando-se assim a fraca influência negativa dos metais na HFDA.

A fosfatase ácida é uma das muitas fosfatases presentes nos solos e é responsável pela mineralização do fosfato orgânico em solos ácidos (Dick et al., 1983; Pant e Warman, 2000). A actividade da fosfatase ácida variou significativamente entre os diferentes locais ($P<0,05$). No entanto, ao contrário das restantes enzimas a sua actividade foi mais elevada nos solos contaminados (Figura 2.5) e correlacionou-se positivamente com a maioria dos metais. Da mesma forma, Kupperman e Carreiro (1997) registaram um aumento da actividade das fosfatases em solos contaminados face ao solo controlo. Embora este resultado não fosse esperado, vários autores demonstraram que a actividade da fosfatase ácida não é um indicador sensível para os efeitos tóxicos dos metais pesados na comunidade microbiana dos solos (Ghorbani et al., 2002; Majer et al., 2002; Nordgren et al., 1986). Por outro lado, o aumento da actividade da fosfatase ácida nos solos mais contaminados poderá estar relacionado com a deficiência em P (Nannipieri et al., 1979). Vários autores mostraram que nos solos deficientes em P há um aumento da secreção desta enzima pelas raízes das plantas de modo a aumentar a solubilização deste elemento (Karthikeyan et al., 2002; Versaw e Harrison, 2002). De facto, a actividade da fosfatase ácida foi superior nos solos BD e BA que simultaneamente apresentaram valores mais baixos de P (15 e 7 mg kg⁻¹, respectivamente). Doelman e Haanstra (1989) demonstraram que a influência dos metais pesados na actividade da fosfatase ácida também pode ser influenciada por outros parâmetros como o conteúdo em matéria orgânica, argilas e sílica.

De acordo com Gianfreda et al. (2005) a actividade enzimática está correlacionada com o pH do solo. Neste estudo não se registaram correlações significativas entre a HFDA, as actividades da DHA e CAT, e o pH. No entanto, verificou-se uma correlação forte e negativa ($r=-0,858$; $P<0,01$) entre a actividade da FAC e este parâmetro (Tabela 2.5), o

que significa que à medida que o pH aumenta e actividade da FAC diminui. De acordo com Eivazi e Tabatabai (1977) a fosfatase ácida é predominante nos solos ácidos e a fosfatase alcalina nos solos básicos. Nos solos amostrados na mina do Braçal não foi detectada actividade da enzima fosfatase alcalina. Estes solos apresentaram um pH baixo o que poderá ter afectado a actividade da fosfatase alcalina. Por outro lado, o efeito do pH baixo ao longo do tempo pode promover alterações na composição e tamanho da comunidade bacteriana e consequentemente afectar a dinâmica enzimática (Hinojosa et al., 2004b).

A actividade da lipase está geralmente associada à degradação de hidrocarbonetos, no entanto existe muito pouca informação em relação ao seu comportamento em solos contaminados com metais. Neste trabalho foi possível observar que a actividade da lipase foi semelhante nos solos BC e BD e mais baixa no solo BA mostrando que a actividade desta enzima apenas foi influenciada por concentrações muito elevadas de metais pesados. As concentrações de As e Pb influenciaram negativamente a actividade da LIP ($r=-0,659$, $P< 0,05$ e $r=-0,709$, $P< 0,05$, respectivamente).

O nosso estudo demonstrou que embora a laboração da mina tenha cessado há 40 anos a actividade mineira e a consequente contaminação do solo com metais pesados tiveram um efeito nocivo nos microrganismos do solo, em particular na actividade enzimática. Enquanto as concentrações de metais foram extremamente elevadas em toda área de estudo, as actividades da DHA e da CAT foram reduzidas, evidenciando o seu potencial como indicadores de contaminação com metais pesados. Uma vez que os microrganismos desempenham funções importantes no solo, a integração da actividade enzimática em análises de risco irá permitir uma melhor avaliação do impacto directo dos metais nas comunidades microbianas do solo.

Capítulo 3

Isolamento, caracterização e determinação da capacidade simbiótica de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

3.1 Introdução

As bactérias que colonizam os sistemas radiculares das plantas e promovem o seu crescimento são designadas por rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (Kloepper e Schroth, 1978). Estas rizobactérias podem promover o crescimento das plantas de forma indirecta através da sua acção contra organismos patogénicos (Guo et al., 2004; Saravanakumar et al., 2008), ou de forma directa através da libertação de determinadas substâncias ou pela ajuda na absorção de nutrientes a partir do meio ambiente (Çakmakçi et al., 2006; Glick, 1995). As rizobactérias podem estar mais ou menos próximas das raízes das plantas existindo um gradiente de proximidade colonizando: (1) a proximidade das raízes e utilizando os metabolitos libertados pelas plantas como fonte de C e N; (2) a superfície das raízes; (3) o interior das raízes entre os espaços das células do córtex ou (4) estruturas especializadas designadas por nódulos radiculares (Gray e Smith, 2005).

Dentro das rizobactérias promotoras do crescimento vegetal podemos salientar as bactérias que nodulam leguminosas, genericamente designadas por rizóbios e que pertencem à α -subclasse das *Proteobacterias* (Young et al., 2001). A taxonomia actual revela a existência de uma grande diversidade ao nível do género, espécie e subespécie.

Estas bactérias são geralmente divididas em 5 géneros: (Sawada et al., 2003; Young et al., 2001): *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997); *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984), *Azorhizobium* (Dreyfus e tal., 1988), *Rhizobium* que inclui os antigos géneros *Allorhizobium* e *Agrobacterium* e o género *Ensifer* (Young, 2003) anteriormente designado por *Sinorhizobium*. O género *Mesorhizobium* pertence à família Phyllobacteriaceae, os géneros *Rhizobium* e *Ensifer* às Rhizobiaceae enquanto os géneros *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* formam um ramo independente (Young et al., 2001).

Vários autores mostraram a importância dos microrganismos do solo na manutenção da fertilidade do mesmo em relação à nutrição vegetal. Um dos maiores contributos é dado pelas associações simbióticas entre leguminosas e bactérias dos géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Ensifer*. A fixação biológica de azoto (FBA) tem vindo a adquirir importância crescente na agricultura, dado que constitui uma alternativa viável à aplicação de fertilizantes azotados, cuja aplicação resulta na contaminação do meio ambiente (Freiberg et al., 1997; Zahran, 1999). A associação entre rizóbio e plantas leguminosas é particularmente eficaz como fonte de azoto fixado por via biológica. No entanto, a eficácia dessa associação depende do estado fisiológico da planta hospedeira (Zahran, 1999), do microsimbionte (Somasegaran e Hoben, 1994) e ainda da interacção entre ambos. A associação *Rhizobium*-leguminosa geralmente é muito específica, contudo existem casos onde a formação de nódulos nas leguminosas deriva de associações com vários tipos de rizóbios (Broughton et al., 2000; Graham e Vance, 2000). A especificidade envolve o reconhecimento da bactéria pelo hospedeiro e deste pela bactéria através de trocas de compostos sinalizadores que induzem a expressão de diferentes genes em ambos os parceiros (Broughton et al., 2000). Vários passos importantes do processo simbiótico, como a formação de nódulos e a fixação de azoto podem ser afectados pelas condições ambientais, que podem ser factores limitantes (Antoun e Prévost, 2005; Chen et al., 2003; Zahran, 1999). Entre os vários factores ambientais que podem afectar negativamente a capacidade de nodulação e a fixação de azoto encontramos a temperatura (Toro e Olivares, 1986; Zurkowski, 1982), a salinidade (Zahran, 1999), o pH (Graham, 1992) e a contaminação por metais pesados (Giller et al., 1989; Giller et al., 1998; McGrath et al., 1988).

Vários autores documentaram os efeitos nefastos dos metais pesados nas populações indígenas de rizóbio e na fixação de azoto (Broos et al., 2004, 2005; Castro et al., 1997; Giller et al., 1989; Giller et al., 1993; McGrath et al., 1988). Rother et al. (1983) estudaram a nodulação e fixação de azoto do trevo branco a crescer em solos altamente contaminados com Cd, Zn e Pb e verificaram a redução do número e tamanho dos nódulos bem como pequenas reduções na actividade da nitrogenase. Por outro lado, McGrath et al. (1988) verificaram que a população indígena de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* de solos contaminados com metais em resultado da aplicação de lamas residuais durante 20 anos, nodulou o trevo branco (*Trifolium repens* L.) mas a fixação de azoto foi completamente suprimida. Como consequência houve uma redução superior a 60% do peso seco do trevo que cresceu nos solos contaminados quando em comparação com os trevos dos solos não contaminados. Na origem destes resultados não esteve a fitotoxicidade directa dos metais, pois ao adicionarem fertilizante azotado, a produção de trevo nos solos contaminados foi restabelecida (Chaudri et al., 1992a; Giller et al., 1989), mas os efeitos dos metais nas bactérias de *Rhizobium* impedindo que o processo simbiótico funcionasse.

A inoculação de leguminosas é uma prática agrícola utilizada há mais de um século que introduz rizóbios no solo (Brockwell e Bottomley, 1995; Deaker et al., 2004; Smith, 1992; Somasegaran e Hoben, 1994; Stephens e Rask, 2000), permitindo introduzir leguminosas fora das suas regiões nativas. A qualidade dos inoculantes depende do número de rizóbios e da sua competitividade com a população indígena do solo na ocupação do nódulo e da eficácia na fixação de azoto (Bloem e Law, 2001; Carter et al., 1995; Okogun e Sanginga, 2003; Stephens e Rask, 2000). Além destas características as estirpes para serem usadas como inoculantes devem mostrar elevada tolerância a condições de stresse ambiental, como temperaturas extremas, pH adversos, seca e metais pesados (Stephens e Rask, 2000), uma vez que a sua persistência no solo também é uma característica muito importante (Carter et al., 1995). Por outro lado, as estirpes de rizóbio bem adaptadas aos stresses ambientais podem ser utilizadas em simbiose com leguminosas em processos de fitorremediação.

A fitorremediação é uma estratégia de elevada relevância na descontaminação de solos com elevadas concentrações de metais pesados, estando dependente da disponibilidade destes elementos nos solos. Alguns autores sugerem a adição de quelantes sintéticos, como o EDTA, para facilitar a solubilização dos metais (Liphadzi et al., 2006; Lopez et al., 2005, 2007; White, 2001). No entanto, a adição de EDTA aos solos constitui uma nova fonte de contaminação uma vez que este composto não é facilmente degradável (White, 2001). Outros autores sugerem a aplicação de fitohormonas para aumentar a absorção dos metais pelas plantas, uma vez que estas promovem o crescimento radicular (Liphadzi et al., 2006; Lopez et al., 2005, 2007). Contudo, a aplicação aos solos de fitohormonas, como o ácido indol acético (IAA), não constitui uma alternativa viável em processos de fitorremediação em larga escala devido ao elevado custo, especialmente nos países menos desenvolvidos. A existência de espécies bacterianas capazes de produzir estes metabolitos secundários e que possam ser potencialmente usadas como complemento em processos de fitorremediação providencia uma alternativa de baixo custo e simultaneamente amiga do ambiente.

Segundo Antoun et al. (1998), além da capacidade de fixar azoto biologicamente com leguminosas, os rizóbios também podem funcionar como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas não leguminosas. Os mecanismos exactos através dos quais as rizobactérias promovem o crescimento vegetal ainda não estão totalmente entendidos, mas podem incluir: 1) a capacidade de produção de reguladores de crescimento como o ácido indol acético, ácido giberélico, citocininas e etileno (Glick, 1995); 2) a fixação não simbiótica de azoto (Boddey e Dobereiner, 1995); 3) serem antagonistas de microrganismos patogénicos através da produção de sideróforos (Scher e Baker, 1982), antibióticos (Shanahan et al., 1992) e HCN (Flaishman et al., 1996) e 4) solubilização de fosfato inorgânico (de Freitas et al., 1997).

O IAA pode ser produzido pela própria planta, no entanto existem muitas rizobactérias com capacidade de produzir esta substância. O aminoácido L-triptofano é o precursor fisiológico para a síntese de auxinas pelas plantas e microrganismos (Frankenberger e Arshad, 1995). Os exsudados das raízes são fontes naturais de L-triptofano para a microflora da rizosfera promovendo o aumento da sua biosíntese.

A produção de sideróforos pelas rizobactérias é também muito importante no crescimento vegetal, uma vez que estes ligam o ferro disponível e impedem a proliferação de organismos fitopatogénicos aumentando a saúde das plantas (Ahmad et al., 2008).

O fósforo é um dos macronutrientes mais importantes para o crescimento vegetal e é aplicado aos solos na forma de fertilizantes fosfatados. Contudo, grandes porções do fosfato inorgânico aplicado aos solos ficam imobilizadas rapidamente tornando-se indisponíveis para as plantas (Golstein, 1986). Assim, a solubilização do fosfato por rizobactérias potencia o aumento da biodisponibilidade deste elemento para as plantas, promovendo o crescimento vegetal (Goldstein, 1986).

Este capítulo teve como principais objectivos:

- Determinar a dimensão da população rizobiana natural dos solos e proceder ao isolamento de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*;
- Verificar a autenticidade dos isolados através de testes de nodulação e através da técnica de *nodC*-PCR;
- Identificar alguns dos isolados utilizando a técnica 16S rDNA-PCR;
- Estudar o efeito dos metais pesados na nodulação e fixação de azoto;
- Avaliar a capacidade de produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal pelos diferentes isolados de rizóbio.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Meios de cultura

O meio de agar de manitol-levedura (AML) (Vincent, 1970) foi utilizado para o isolamento das estirpes de *Rhizobium* assim como para a sua conservação, tendo a seguinte composição por litro:

K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10 g
Extracto levedura	0,5 g
Agar	15 g
pH 6,8	

O meio peptona, glucose e agar (PGA) (Somasegaren e Hoben, 1994) suplementado com púrpura de bromocresol (BCP) foi usado no isolamento das estirpes de *Rhizobium* tendo a seguinte constituição por litro:

Peptona	10 g
Glucose	5 g
Agar	15 g
BCP	100 mg
pH 6,8	

O meio de triptona (TY – do inglês *tryptone yeast*) (Beringer et al., 1984) foi utilizado para o crescimento dos isolados de *Rhizobium* para se realizar a extracção do DNA total tendo a seguinte constituição por litro:

Triptona	5 g
Extracto de levedura	3 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,9 g
Agar	15 g
pH 7	

O meio de Jensen (Jensen, 1942) foi utilizado como solução nutritiva para o crescimento das plantas, assim como no teste de autenticidade dos isolados tendo a seguinte composição por litro:

CaHPO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl ₃	0,1 g
Solução micronutrientes	1 ml
Agar	15 g
pH 6,5	

Composição da solução de micronutrientes, por litro:

H ₃ BO ₃	2,8 g
MnSO ₄ H ₂ O	1,39 g
ZnCl ₂	0,1 g
MoO ₃	0,071 g
CuSO ₄ .3H ₂ O	0,078 g

3.2.2 Determinação da população de *Rhizobium* pelo método do número mais provável (NMP)

A população rizobiana natural dos diferentes solos foi determinada através do método do número mais provável usando o *Trifolium repens* L. (trevo branco) cultivar Huia como planta hospedeira. As sementes foram esterilizadas por imersão em álcool etílico durante 1 min, seguindo-se a imersão das mesmas numa solução de bicloreto de mercúrio acidulada (0,1% (m/v) HgCl_2 em 0,5% HCl (v/v)), durante 5 min. De seguida realizaram-se 6 lavagens com água destilada esterilizada durante 1 min cada. Para a germinação utilizaram-se placas de Petri com agar de água (15%). As placas foram invertidas e incubadas 48 h a 27 °C.

As plântulas de trevo branco foram colocadas em frascos com 8 ml de meio de Jensen previamente esterilizados. Após 2 dias, procedeu-se à inoculação com 1 ml das suspensões de solos obtidas após diluições em série de 1/10 em água destilada estéril. Para cada diluição fizeram-se 3 réplicas. Nos controlos utilizaram-se igual número de frascos tendo-se inoculado no caso do controlo T0 1 ml de água destilada e no caso do controlo TN 1 ml de solução de azoto (0,05% (m/v) KNO_3). Os frascos foram colocados em câmaras climatizadas com luz e temperatura controladas (fotoperíodo de 12 h e temperatura diurna e noturna de 22 °C e 15 °C, respectivamente). As plantas foram retiradas após 8 semanas de crescimento e observou-se a presença ou ausência de nódulos, tendo o número de bactérias g^{-1} de solo sido calculado em função das tabelas de Brockwell (1963).

3.2.3 Isolamento e caracterização morfológica de *Rhizobium*

Para o isolamento das bactérias de *Rhizobium* utilizou-se como planta armadilha o *Trifolium repens* L. (trevo branco) cultivar Huia. As sementes foram esterilizadas de acordo com o descrito em 3.2.2. As plântulas de trevo foram colocadas em vasos contendo 50 g de solo de cada local. Para cada solo foram realizadas 3 réplicas. Os vasos foram colocados em câmaras climatizadas com luz e temperatura controladas (fotoperíodo de 12 h e temperatura diurna e noturna de 22 °C e 15 °C, respectivamente)

durante 8 semanas. Após as quais se efectuou a colheita das plantas e se procedeu à extracção dos nódulos radiculares, registando-se as suas características principais (tamanho e cor).

Os nódulos foram colocados em álcool etílico durante 30 seg e desinfectados em hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) durante 2 min. Seguidamente, os nódulos foram lavados 6 vezes com água destilada esterilizada durante 1 min cada, tendo-se depois procedido ao seu esmagamento na superfície de placas com meio AML suplementado com 0,25% (m/v) de vermelho de Congo. As placas foram incubadas 5 dias a 28 °C. De modo a obter culturas puras de *Rhizobium* foram realizados riscados até à exaustão em meio AML suplementado com vermelho de Congo (CR) e suplementado com 0,25% (m/v) de azul de bromotimol (BTB). As placas foram novamente colocadas a incubar a 28 °C durante 3 dias e colónias isoladas de cada uma das estirpes foram repicadas para meio AML. Estas mesmas colónias foram também colocadas a crescer no meio de peptona e glucose com púrpura de bromocresol uma vez que o *Rhizobium* apresenta um crescimento reduzido ou inexistente neste meio permitindo distinguir eventuais contaminações.

3.2.3.1 Conservação das culturas

De modo a preservar as culturas de *Rhizobium*, as suas estirpes foram repicadas para frascos contendo meio AML suplementado com 3 g l⁻¹ de carbonato de cálcio. O carbonato de cálcio neutraliza o ácido produzido pelo metabolismo bacteriano prolongando o tempo de manutenção das culturas (Vincent, 1970). Após 5 dias de crescimento a 28 °C, os isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* foram colocados a 4 °C. Posteriormente a colecção foi guardada a -20 °C em meio ML líquido adicionado com 15% (v/v) de glicerol.

3.2.4 Autenticidade dos isolados de *Rhizobium*

A autenticidade dos isolados como culturas puras de *Rhizobium* foi confirmada pelo teste de nodulação usando o trevo branco como planta hospedeira. Plântulas de trevo branco, provenientes de sementes esterilizadas e germinadas, de acordo com o descrito anteriormente (3.2.2) foram transferidas para frascos com 8 ml de meio de

Jensen sólido. Estes foram inoculados com 1 ml de cada estirpe e colocados em câmaras climatizadas com luz e temperatura controladas (fotoperíodo de 12 h e temperatura diurna e noturna de 22 °C e 15 °C, respectivamente) durante 8 semanas. Após este período observaram-se as raízes, anotando-se a presença ou ausência de nódulos radiculares.

3.2.5 Gene *nodC*

Uma vez que alguns dos isolados apresentaram um resultado negativo no teste de nodulação procedeu-se à confirmação da sua autenticidade usando a técnica *nodC*-PCR. A amplificação do gene *nodC* foi realizada de acordo com Laguerre et al. (2001) e utilizaram-se as seguintes sequências de *primers*: *nodCF* (*Forward*) - 5' AGGTGGTyGAYGACGGTTC 3' e *nodCI* (*Reverse*) – 5' CGyGACAGCGAnTCKCTATTG 3'. As sequências acima descritas permitem amplificar dois fragmentos com um tamanho esperado de 930 pb e 500 pb.

3.2.5.1 Preparação das amostras

As culturas de *Rhizobium* mantidas em AML a 4 °C foram repicadas para placas contendo meio TY (Beringer et al., 1984) e mantidas durante 3 dias a 28 °C. De seguida, retirou-se uma ansada de cada isolado e inocularam-se tubos de 5 ml contendo TY líquido. Os tubos foram incubados a 28 °C, com agitação a 150 rpm, até à fase exponencial de crescimento. Transferiu-se 1 a 1,5 ml de cada cultura para microtubos e as células foram recolhidas após centrifugação a 8000 g, durante 5 min a 4 °C.

3.2.5.2 Extracção do DNA bacteriano total

A extracção de DNA total foi realizada de acordo com Vogelstein e Gillespie (1979) usando o Kit *NucleoSpin* Tissue. Para o processamento das amostras seguiu-se as especificações do protocolo que acompanha o Kit.

As células foram ressuspensas em 180 µl de tampão de lise e 25 µl de proteinase K (20 mg ml⁻¹) e a mistura homogeneizada num vórtex e incubada durante 3 h num banho a 56 °C. Após o período de incubação adicionou-se 200 µl de solução B3 (tampão de lise), homogeneizou-se no vórtex e incubou-se a mistura a 70 °C durante 10

min. De seguida adicionou-se 210 µl de etanol absoluto e agitou-se de imediato no vórtex. Cada amostra foi colocada numa coluna *NucleoSpin Tissue* e centrifugada 1 min a 11000 g. Descartou-se o eluído que passou para o tubo colector e adicionou-se 600 µl de tampão de lavagem concentrado e centrifugou-se 1 min a 11000 g. Repetiu-se novamente o procedimento. De seguida centrifugou-se a amostra durante 2 min de modo a retirar o tampão residual. Colocou-se a coluna num novo microtubo de 1,5 ml e adicionou-se 100 µl de tampão de eluição. Incubou-se 1 min a 70 °C e centrifugou-se 1 min a 11000 g.

3.2.5.3 *nodC*-PCR

Nas reacções de PCR utilizou-se o Kit-Master Mix Quiagen (Taq polimerase, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada DNTP). As reacções foram realizadas para um volume de 20 µl e a mistura de reacção continha: 15,8 µl de MasterMix, 1 µl de *primer nodCF* (10 pmol µl⁻¹), 1 µl de *primer nodCI* (10 pmol µl⁻¹), 1 µl de água MILLI-Q estéril, 0,2 µl de BSA e 1 µl de DNA.

As reacções de PCR foram realizadas num termociclador Eppendorf MasterCycle com as seguintes condições: 3 min de desnaturação inicial a 94 °C, seguidos de 30 ciclos de desnaturação 45 seg a 94 °C, emparelhamento 1 min a 58 °C e extensão 2 min a 72 °C. A reacção de PCR foi finalizada com uma extensão final de 10 min a 72 °C.

Os produtos obtidos foram visualizados num gel de agarose a 1% (m/v) em TBE utilizando uma voltagem de 70 V durante 30 min e 2 h com voltagem de 80 V. Utilizou-se um marcador de 1 kb (*Gene Ruler*TM 1 kb DNA Ladder - Fermentas).

O gel foi corado numa solução de brometo de etídio a 0,5 µg ml⁻¹ durante 15 min.

3.2.6 Identificação dos isolados por 16S rDNA

A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada de acordo com Laguerre et al. (1994; 1996) e utilizaram-se as seguintes sequências de *primers*: fD1 (*Forward*) - 5' AGAGTTTGATCCTGGCTAG 3' e rD1 (*Reverse*) - 5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3'. As sequências acima descritas permitem amplificar um fragmento de 1500 pb.

3.2.6.1 Preparação das amostras

De acordo com o método de preparação descrito em 3.2.5.1

3.2.6.2 Extracção do DNA bacteriano total

De acordo com o método de extracção descrito em 3.2.5.2

3.2.6.3 16S rDNA - PCR

Nas reacções de PCR utilizou-se o Kit-Master Mix Quiagen (Taq polimerase, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada DNTP). As reacções foram realizadas para um volume de 20 µl e a mistura de reacção continha: 15,8 µl de MasterMix, 1 µl de *primer* fD1 (10 pmol µl⁻¹), 1 µl de *primer* rD1 (10 pmol µl⁻¹), 1 µl de água MILLI-Q estéril, 0,2 µl de BSA e 1 µl de DNA.

As reacções de PCR foram realizadas num termociclador Eppendorf MasterCycle com as seguintes condições: 3 min de desnaturação inicial a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de desnaturação 1 min a 94 °C, emparelhamento 1 min a 55 °C e extensão 2 min a 72 °C. A reacção de PCR foi finalizada com uma extensão final de 3 min a 72 °C.

Os produtos obtidos foram visualizados num gel de agarose a 1% (m/v) em TBE utilizando uma voltagem de 70 V durante 30 min e 2 h com voltagem de 80 V. Utilizou-se um marcador de 1 kb (*Gene Ruler*TM 1 kb DNA Ladder - Fermentas).

O gel foi corado numa solução de brometo de etídio a 0,5 µg ml⁻¹ durante 15 min.

3.2.6.4 Sequenciação

As reacções de sequenciação foram realizadas pela empresa MWG (Alemanha). Em seguida, as sequências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleótidos através do programa Blastn (Altschul et al., 1990), para comparação com sequências homólogas depositadas no banco de dados público mundial GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.2.7 Capacidade simbiótica

3.2.7.1 Determinação do peso seco das plantas de trevo

Plântulas de trevo branco, provenientes de sementes esterilizadas e germinadas, de acordo com o descrito anteriormente (3.2.2) foram transferidas para frascos com 8 ml de meio de Jensen sólido. Em seguida, procedeu-se à inoculação com 1 ml de cada isolado e fizeram-se 3 réplicas. Nos controlos utilizou-se igual número de frascos tendo-se inoculado no caso do controlo T0 1 ml de água destilada e no caso do controlo TN 1 ml de solução de azoto (0,05% (m/v) KNO_3). Os frascos foram colocados em câmaras climatizadas com luz e temperatura controladas (fotoperíodo de 12 h e temperatura diurnas e noturnas de 22 °C e 15 °C, respectivamente) durante 8 semanas, ao fim das quais as partes aéreas das plantas de trevo branco foram cortadas para a posterior determinação do peso seco a 60 °C. Calculou-se a média dos pesos secos das plantas controlo (TN e T0) e das plantas inoculadas com cada um dos isolados, considerando-se nestas últimas apenas as plantas noduladas. Para se obter o índice de eficácia simbiótica relativa (ESR), utilizaram-se as médias de pesos secos (PS) por isolado e calculou-se a sua percentagem em relação ao controlo com azoto (TN), de acordo com a seguinte equação $[(PS-T0) \times 100] / (TN-T0)$ (Ferreira e Marques, 1992).

3.2.8 Produção de substâncias promotoras de crescimento

Os diferentes isolados foram caracterizados do ponto de vista de produção de substâncias promotoras de crescimento (SPCV).

3.2.8.1 Ácido indol acético (IAA)

Para determinar a capacidade de produção de IAA, os isolados cresceram em meio AML suplementado com diferentes concentrações do aminoácido precursor L-triptofano (100 e 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$) até atingirem 1,0 de densidade óptica (600 nm) a 28 °C com agitação (150 rpm). De seguida, as células foram centrifugadas a 10000 g durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante recolhido para um novo tubo. Para determinar a quantidade de IAA produzido pelos diferentes isolados utilizaram-se 500 μl de sobrenadante e 200 μl de

Reagente de Salkowsky (0,5 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 35% ácido perclórico) e incubou-se a mistura 10 min à temperatura ambiente. Registou-se a absorvância a 530 nm e o conteúdo em IAA foi determinado usando como solução padrão IAA (Sigma).

3.2.8.2 Produção de sideróforos

A capacidade dos isolados de rizóbio em produzirem sideróforos foi determinada usando meio AML suplementado com uma solução indicadora constituída por 1,21 mg ml⁻¹ de azul de cromocresol, 0,1 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 1,82 mg ml⁻¹ de CTAB. Os isolados foram incubados 6 dias a 28 °C. A produção de sideróforos caracteriza-se pela alteração da cor das colónias para laranja.

3.2.8.3 Capacidade de solubilizar fosfato inorgânico

A capacidade de solubilização do fosfato dos isolados de rizóbio foi determinada usando o meio Pikovskaya modificado (por litro: 10 g manitol, 0,5 g extracto levedura, 0,2 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g CaHPO_4 , 0,002 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,002 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g agar). Os isolados foram incubados a 28 °C durante 7-10 dias. De seguida, observou-se a presença/ausência de um halo transparente à volta das colónias. A presença do halo é indicativa da solubilização do fosfato.

3.2.9 Análise estatística

As diferenças significativas entre os pesos secos dos diferentes isolados foram avaliadas através de uma ANOVA unifactorial com aplicação do teste de Tukey ($P < 0,05$), realizada com o programa SigmaStat 3.5. O resultados obtidos para a produção de IAA foram submetidos a uma ANOVA bifactorial com aplicação do teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.3 Resultados






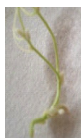
3.3.1 Determinação da população de *Rhizobium* indígena dos solos

A dimensão da população natural de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, determinada através do NMP, foi muito superior no solo na periferia da mina (BC) do que nos solos mais contaminados (BD e BA). O número de rizóbios registado nos solos BD e BA foi de 9,1 bactérias g⁻¹ de solo e 7,3 bactérias g⁻¹ de solo, respectivamente, enquanto no solo BC o número de rizóbios determinado foi de 4,24x10⁴ bactérias g⁻¹ de solo.

3.3.2 Isolamento de *Rhizobium* de nódulos radiculares de trevo branco

Na Tabela 3.1 podemos observar algumas das características (origem, cor) dos isolados de rizóbio utilizados neste estudo.

Tabela 3.1 – Isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* recolhidos dos nódulos radiculares de plantas de trevo branco (*Trifolium repens* L.) crescidas em vasos contendo os solos dos diferentes locais da mina do Braçal (BC, BD e BA).

Origem	Isolados	Nódulos		Origem	Isolados	Nódulos		Origem	Isolados	Nódulos	
		Cor	Imagem			Cor	Imagem			Cor	Imagem
BC	C 1-1	rosa		BD	D 1-2	branco		BA	A 6-1	branco	
	C 1-2	rosa			D 1-3	branco			A 8-1	branco	
	C 1-3	rosa			D 1-4	branco			A 10-3	branco	
	C 1-4	rosa			D 2-1	rosa			A 14-2	branco	
	C 2-1	rosa			D 2-2	rosa			A 16-2	branco	
	C 2-2	rosa			D 2-4	rosa			A 17-3	branco	
	C 3-1	rosa			D 3-1	branco			A 18-1	branco	
	C 3-2	rosa			D 3-2	branco			A 18-2	branco	
	C 3-4	rosa			D 6-2	rosa			A 18-4	branco	
	C 5-4	branco			D 6-4	rosa			A 21-3	branco	
	C 8-4	branco							A 21-4	branco	
	C 10-3	branco									
	C 11-1	branco									
	C 11-3	branco									

Os isolados de *Rhizobium* foram obtidos dos nódulos radiculares das plantas de trevo branco crescidas nos diferentes solos das minas do Braçal (BC, BD e BA). Deste modo, obtiveram-se 35 isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*: 14 do solo BC, 10 do solo BD e 11 do solo BA. Na maioria dos casos procedeu-se ao isolamento de vários isolados do mesmo nódulo (ex: C 1-1, C 1-2, C 1-3, C 1-4). Os nódulos recolhidos das plantas de

trevo que cresceram no solo BC apresentaram, na sua maioria, cor rosa e tamanho superior a 3 mm. Do crescimento das plantas de trevo nos solos contaminados (BD e BA) resultaram nódulos geralmente brancos e de tamanho reduzido (< 2mm), especialmente em BA.

Na Figura 3.1 podemos observar o comportamento de vários isolados nos meios diferenciais usados neste estudo. Estes meios permitem diferenciar bactérias pertencentes ao género *Rhizobium* de outras bactérias contaminantes.

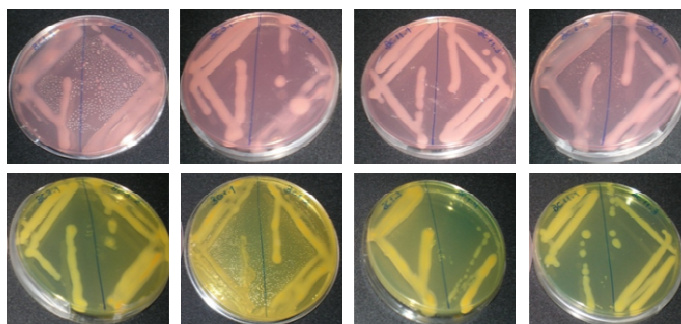


Figura 3.1 - Isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* crescidos em meio AML suplementado com vermelho de Congo e em AML suplementado com azul de bromotimol.

O comportamento dos diferentes isolados de *Rhizobium* no meio AML suplementado com vermelho de Congo (AML-CR) foi o esperado uma vez que a absorção deste corante pelas bactérias foi reduzida dando origem a colónias de cor branca ou rosa claro (Figura 3.1). Relativamente ao crescimento dos isolados no meio AML suplementado com azul de bromotimol (AML-BTB) verificou-se que ocorreu uma mudança da cor do meio. A alteração de cor deve-se à acidificação do meio em resultado da libertação de exopolissacarídeos pelas bactérias. Esta é uma característica dos rizóbios de crescimento rápido, como os pertencentes ao género *Rhizobium*.

3.3.3 Autenticidade dos isolados

Embora o crescimento dos isolados em meios diferenciais seja uma boa ferramenta para distinguir o rizóbio de possíveis bactérias contaminantes, por si só não é suficiente para confirmar a sua autenticidade. Assim, procedeu-se a um teste de nodulação, em meio de Jensen utilizando o trevo branco cv. Huia como planta hospedeira.

Tabela 3.2 – Presença (+) e ausência (-) de nódulos nas raízes das plantas de trevo branco, após inoculação com os diferentes isolados.

Nódulos		Nódulos		Nódulos	
C 1-1	+	D 1-2	+	A 6-1	-
C 1-2	+	D 1-3	-	A 8-1	-
C 1-3	-	D 1-4	-	A 10-3	-
C 1-4	+	D 2-1	+	A 14-2	-
C 2-1	+	D 2-2	+	A 16-2	-
C 2-2	+	D 2-4	+	A 17-3	-
C 3-1	+	D 3-1	+	A 18-1	-
C 3-2	+	D 3-2	+	A 18-2	-
C 3-4	+	D 6-2	+	A 18-4	-
C 5-4	+	D 6-4	+	A 21-3	-
C 8-4	+			A 21-4	-
C 10-3	+				
C 11-1	+				
C 11-3	+				

Na Tabela 3.2 podemos observar os resultados obtidos no teste nodulação, ou seja a presença/ausência de nódulos nas raízes das plantas de trevo branco inoculadas com os diferentes isolados. Assim, verificou-se que as plantas inoculadas com os isolados C apresentaram nódulos nas suas raízes com exceção dos trevos inoculados com o isolado C 1-3. Similarmente, as plantas de trevo inoculadas com os diferentes isolados D também apresentaram nódulos, com exceção dos trevos inoculados com os isolados D 1-3 e D 1-4. Relativamente aos isolados A não se observaram nódulos nas plantas de trevo inoculadas com nenhum dos isolados. Este resultado foi inesperado uma vez que

estes isolados nodularam as plantas de trevo aquando do seu isolamento. Por outro lado, apresentaram um comportamento similar aos restantes isolados nos meios diferenciais, não tendo sido por isso colocada a hipótese dos isolados não pertencerem ao género *Rhizobium*. Deste modo, procedeu-se à análise do gene *nodC* de forma a verificar a autenticidade dos isolados como pertencentes ao género *Rhizobium*. A amplificação por PCR do gene *nodC* com os *primers* descritos em 3.2.5 resulta em duas bandas de pesos moleculares iguais a 930 pb (Laguérre et al., 2001) e 500 pb (Carrasco et al., 2005).

A amplificação por PCR do gene *nodC* dos isolados C está apresentada na Figura 3.2. Os isolados C apresentaram as duas bandas com os pesos moleculares esperados. No entanto, o isolado C 1-3 apresentou apenas a banda de 930 pb e os isolados C 8-4 e C 10-3 a banda de 500 pb.

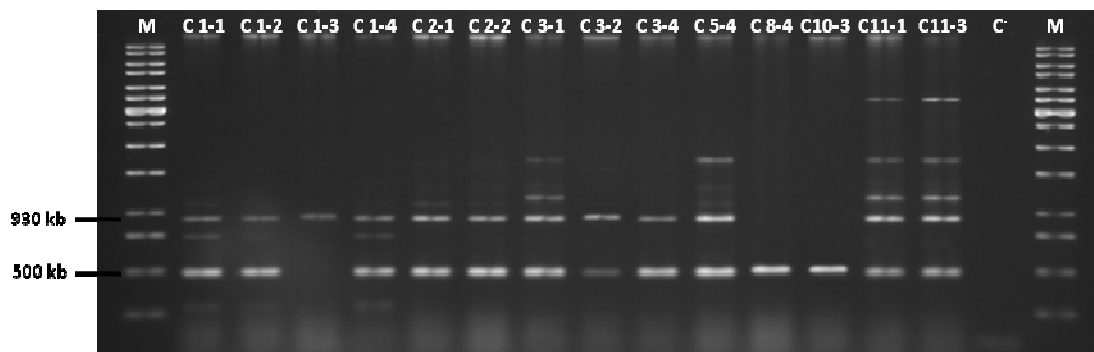


Figura 3.2 – Electroforese representativa da amplificação por PCR do gene *nodC* referente aos isolados C; M – marcador de pesos moleculares de 1 kb; C⁻ - controlo negativo (sem DNA).

A amplificação por PCR do gene *nodC* dos isolados D está apresentada na Figura 3.3. Neste caso, não se verificou a amplificação da banda de 930 pb em nenhum dos isolados. No entanto, a banda de 500 pb foi amplificada na maioria das estirpes com excepção dos isolados D 1-3 e D 1-4. Relativamente aos isolados A verificou-se que as bandas esperadas (930 e 500 pb) não foram amplificadas em nenhum dos isolados testados (Figura 3.4).

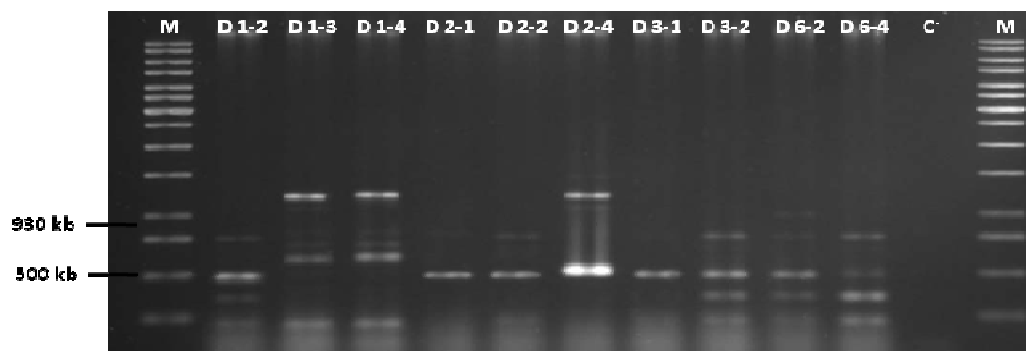


Figura 3.3 – Electroforese representativa da amplificação por PCR do gene *nodC* referente aos isolados de D; M – marcador de pesos moleculares de 1 kb; C⁻ - controlo negativo (sem DNA).

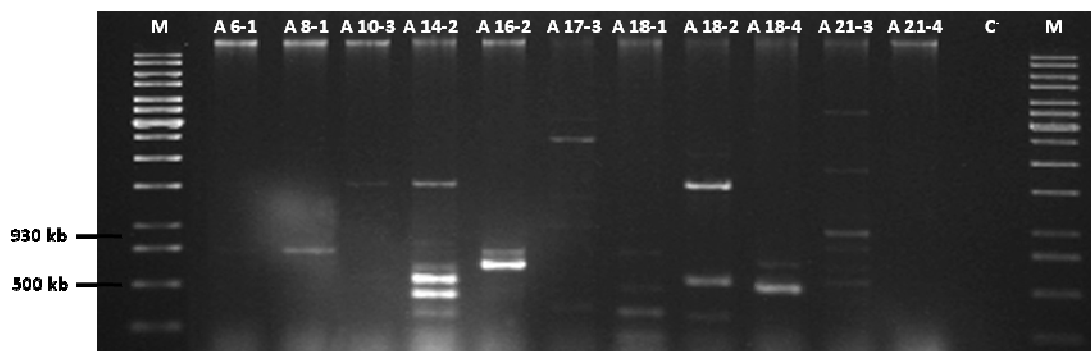


Figura 3.4 – Electroforese representativa da amplificação por PCR do gene *nodC* referente aos isolados A; M – marcador de pesos moleculares de 1 kb; C⁻ - controlo negativo (sem DNA).

3.3.4. Identificação de isolados de *Rhizobium* por 16S rDNA-PCR

Os resultados obtidos para a amplificação do gene *nodC* não foram conclusivos para alguns dos isolados, especialmente para os provenientes do solo A. Assim, procedeu-se à análise do gene 16S rDNA com o objectivo de proceder à sua identificação. Nas Figuras 3.5, 3.6 e 3.7 é possível observar os géis de electroforese referentes à amplificação do gene 16S rDNA para os diferentes isolados de *Rhizobium*. Todos os isolados evidenciaram uma banda de 1500 pb.

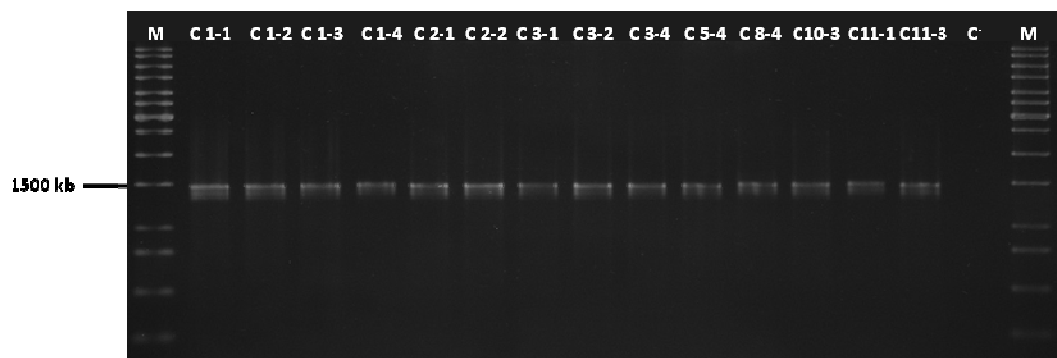


Figura 3.5 – Electroforese representativa da amplificação por PCR do 16S rDNA referente aos isolados C; M – marcador de peso molecular de 1 kb; C⁻ - controlo negativo (sem DNA).

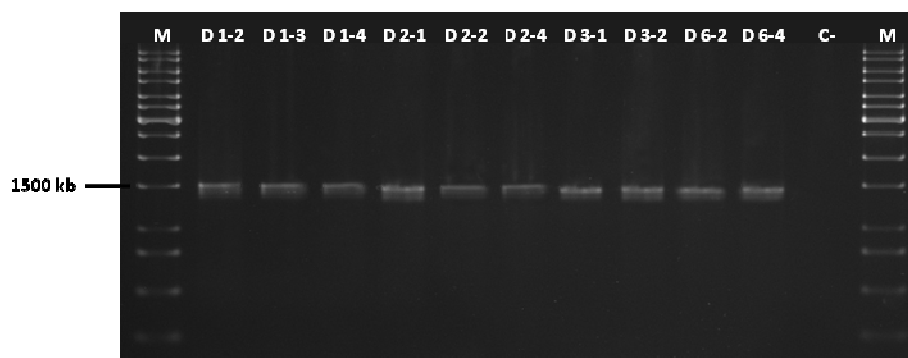


Figura 3.6 – Electroforese representativa da amplificação por PCR do 16S rDNA referente aos isolados D; M – marcador de peso molecular de 1 kb; C⁻ - controlo negativo (sem DNA).

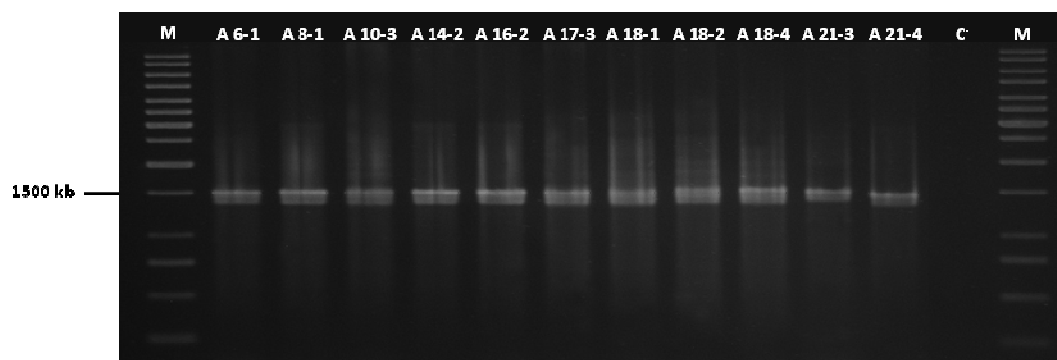


Figura 3.7 – Electroforese representativa da amplificação por PCR do 16S rDNA referente aos isolados A; M – marcador de peso molecular de 1 kb; C⁻ - controlo negativo (sem DNA).

A sequenciação do produto amplificado foi realizada pela empresa MWG mas apenas para os isolados A 10-3, A 17-3 e A 18-4. Seguidamente, as sequências obtidas

foram submetidas à consulta de similaridade de nucleótidos através do programa BLASTN (Altschul et al., 1990), para comparação com sequências homólogas depositadas no banco de dados público mundial GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI), tendo-se obtido os resultados apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Identificação dos isolados com base nas sequências parciais do gene 16S rDNA utilizando o programa BLASTN.

Isolado	Organismo de Referência	Tamanho fragmento (pb)	% Similaridade
A 10-3	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325	891	99
A 18-4	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325	964	83
A 18-4	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB 400	964	99
A 17-3	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> WSM1325	240	93

As sequências obtidas para cada um dos isolados foram comparadas com o organismo de referência *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325(NC. 012850.1). O isolado A 10-3 apresentou uma similaridade de 99% com o organismo de referência. Relativamente ao isolado A 18-4 a sua similaridade com o organismo de referência foi de apenas 83%. Por este motivo realizou-se uma pesquisa na base de dados de forma a encontrar organismos cuja percentagem de similaridade com o isolado A 18-4 fosse superior. Deste modo, observou-se uma percentagem de similaridade igual a 99% com a bactéria *Burkholderia xenovorans*. O isolado A 17-3 apresentou uma similaridade de 93% com o organismo de referência.

3.3.5 Avaliação da capacidade simbiótica dos isolados de *Rhizobium*

A avaliação da eficiência simbiótica foi efectuada mediante a determinação dos pesos secos das plantas de trevo branco (*Trifolium repens* L.) inoculadas com os diferentes isolados. A média dos pesos secos das plantas inoculadas com os isolados C 1-3, D 1-3, D 1-4 e de todos os isolados A não estão apresentadas uma vez que para a avaliação da eficiência simbiótica apenas foram consideradas as plantas noduladas e as plantas inoculadas com estes isolados não apresentaram nódulos.

Na Figura 3.8 estão apresentadas as médias dos pesos secos das partes aéreas das plantas inoculadas com cada um dos isolados C. Podemos observar que nenhuma das plantas inoculadas obteve valores de peso seco iguais ou superiores aos controlos com adição de azoto (TN). Dos 14 isolados testados, originários de nódulos de plantas de trevo branco crescidas no solo BC (solo controlo), 9 apresentaram valores de pesos secos muito baixos (entre 0,83 e 2,67 mg), quando comparados com o controlo (TN). Apenas 4 isolados (C 1-2, C 3-2, C 1-4 e C 2-1) foram considerados eficazes, uma vez que o índice de eficácia simbiótica relativa (ESR) foi superior a 17% tendo atingido os 57% para isolado C 1-2.

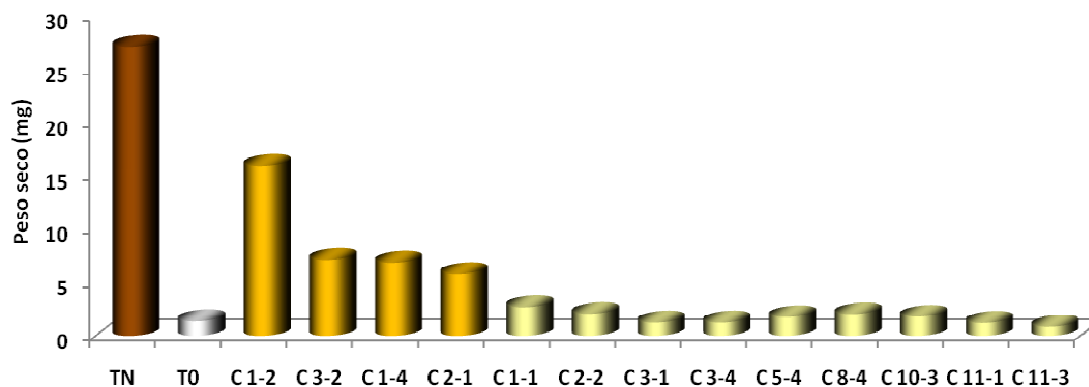


Figura 3.8 – Médias dos pesos secos das partes aéreas das plantas de trevo branco inoculados com os isolados C. TN – inoculado com 1 ml de 0,05% (m/v) KNO_3 ; T0 – inoculada com 1 ml água destilada. ■ - eficazes; ■ - ineficazes.

Relativamente aos isolados originários de nódulos de plantas de trevo branco que cresceram no solo medianamente contaminado (BD), verificou-se que apenas o isolado D 2-2 fixou azoto, tendo apresentado um índice ESR igual a 35% (Figura 3.9). As plantas de trevo inoculadas com os restantes 7 isolados apresentaram valores de peso seco que variaram entre 0,73 e 2,37 mg estando assim muito próximos do valor de peso seco do T0 (1,37 mg), tendo por isso sido consideradas ineficazes.

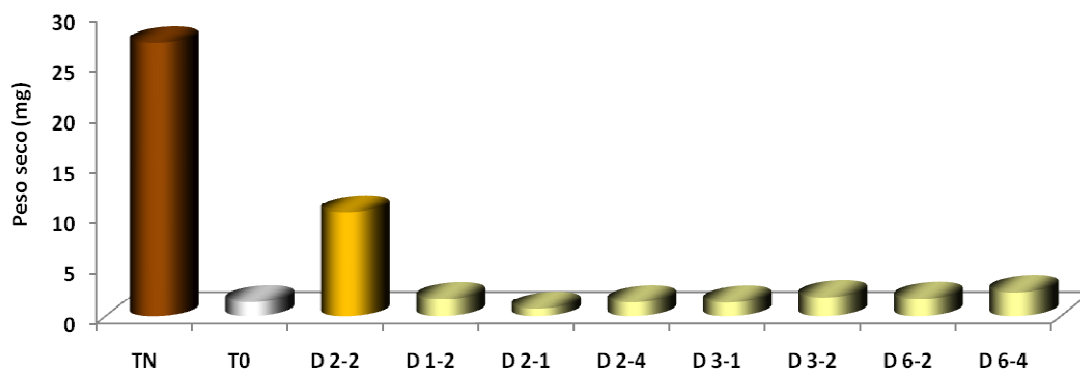


Figura 3.9 – Médias dos pesos secos das partes aéreas das plantas de trevo branco inoculados com os isolados D. TN – inoculado com 1 ml de 0,05% (m/v) KNO_3 ; T0 – inoculada com 1 ml água destilada. ■ - eficazes; ■ - ineficazes.

3.3.6 Produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal

3.3.6.1 Produção de Ácido indol acético (IAA)

A determinação do IAA foi realizada no início da fase estacionária, uma vez que de acordo com García de Salamone et al. (2001) a produção do IAA ocorre apenas nesta fase possivelmente devido ao atraso na indução da enzima chave para a via de biosíntese do IAA. Os 35 isolados testados produziram IAA na presença de diferentes concentrações ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $300 \mu\text{g ml}^{-1}$) de L-triptofano (TPF).

A produção de IAA variou significativamente entre os isolados C ($P < 0,05$). Para grande parte dos isolados C verificou-se um aumento significativo de IAA quando a concentração de TPF aumentou de 100 para $300 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura 3.10). No entanto, para os isolados C 1-3, C 3-4, C 5-4, C 8-4 e C 10-3 o aumento da TPF não produziu qualquer efeito na quantidade de IAA produzido. Na presença de $300 \mu\text{g ml}^{-1}$ de TPF, os isolados C 1-4, C 2-2 e C 11-3 produziram níveis de IAA superiores a $120 \mu\text{g ml}^{-1}$.

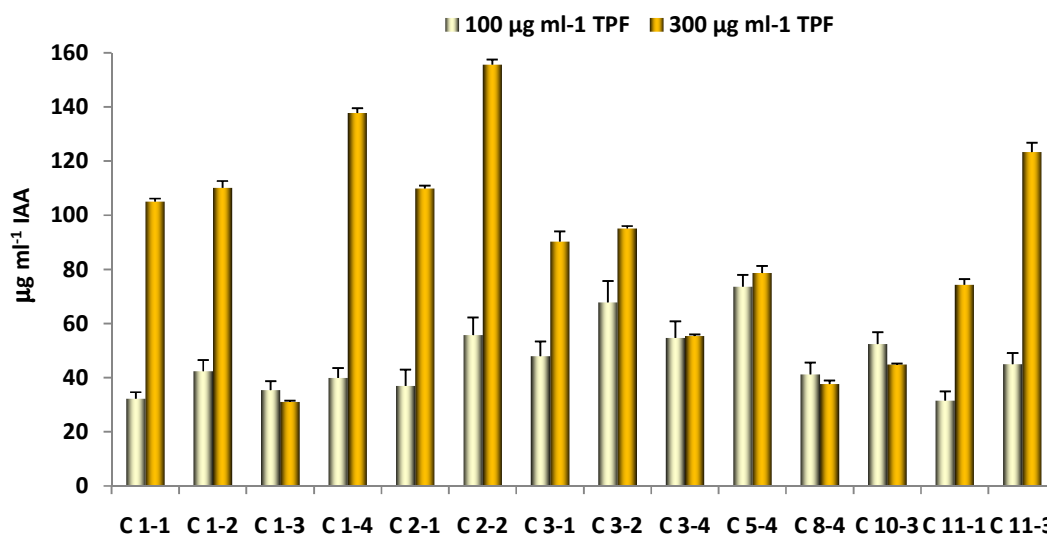


Figura 3.10 – Produção de IAA pelos isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do local BC com adição ao meio de crescimento de 100 µg ml⁻¹ e 300 µg ml⁻¹ de L-triptofano.

Os isolados D produziram concentrações muito reduzidas de IAA em comparação com os isolados C (Figura 3.11). O isolado D 2-1 foi o único que produziu concentrações de IAA semelhantes às registadas nos isolados C. Por outro lado, a produção de IAA não foi afectada pelo aumento de TPF (300 µg ml⁻¹) no meio de crescimento.

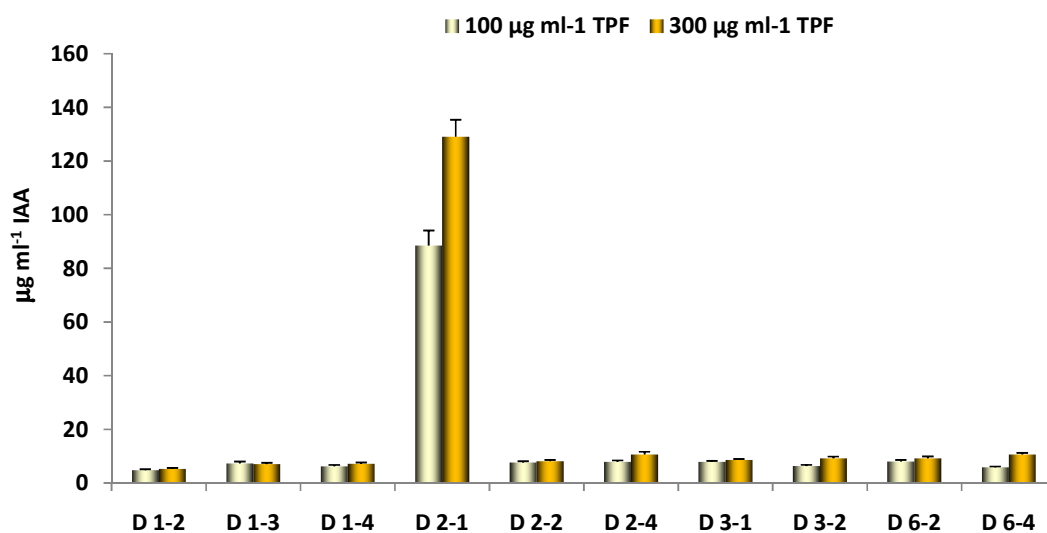


Figura 3.11 – Produção de IAA pelos isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do local BD com adição ao meio de crescimento de 100 µg ml⁻¹ e 300 µg ml⁻¹ de L-triptofano.

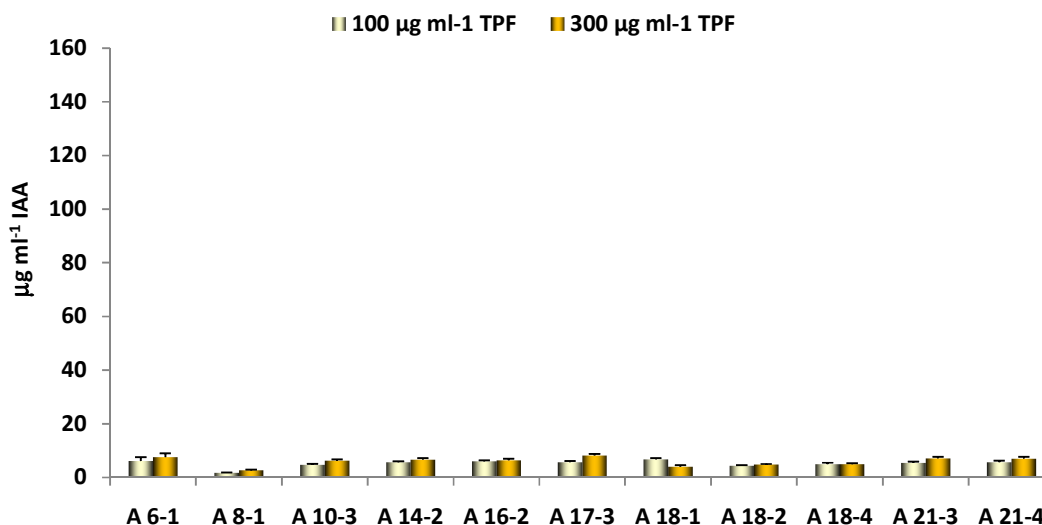


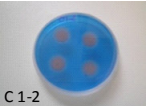
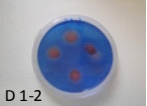
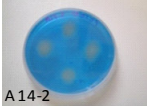
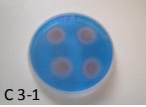
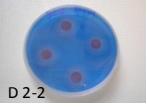
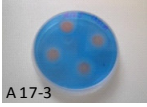
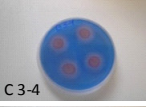
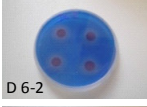
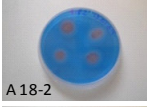
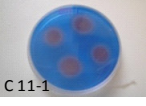
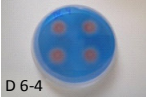
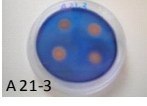
Figura 3.12 – Produção de IAA pelos isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do local BA com adição ao meio de crescimento de 100 µg ml⁻¹ e 300 µg ml⁻¹ de L-triptofano.

A produção de IAA nos isolados provenientes do local muito contaminado (BA) foi semelhante à verificada para os isolados D (Figura 3.12). Na maioria dos isolados para a concentração de TPF mais elevada (300 µg ml⁻¹) não se verificou uma maior produção de IAA. O isolado A 8-1 foi o isolado que produziu menor quantidade de IAA. No isolado A 18-1 verificou-se que a produção de IAA foi maior na presença de menor quantidade de precursor no meio de crescimento.

3.3.6.2 Produção de sideróforos

Neste trabalho, a capacidade de produzir sideróforos foi analisada através da alteração de cor branca das colónias para laranja. Os isolados de todos os locais de amostragem apresentaram capacidade de produzir sideróforos, com excepção dos isolados D 3-1, A 6-1 e A 14-2 (Tabela 3.4). Os isolados C e D mostraram maior capacidade de produzir sideróforos do que os isolados A.

Tabela 3.4 – Produção sideróforos dos diferentes isolados; (+) reduzida; (++) moderada; (+++) elevada; (-) ausência de produção de sideróforos.

Sideróforos			Sideróforos			Sideróforos		
C 1-1	++		D 1-2	+++		A 6-1	-	
C 1-2	++		D 1-3	++		A 8-1	+	
C 1-3	+		D 1-4	+		A 10-3	+	
C 1-4	++		D 2-1	+		A 14-2	-	
C 2-1	++		D 2-2	++		A 16-2	+	
C 2-2	++		D 2-4	+++		A 17-3	++	
C 3-1	++		D 3-1	-		A 18-1	+	
C 3-2	++		D 3-2	+++		A 18-2	++	
C 3-4	+++		D 6-2	+++		A 18-4	+++	
C 5-4	+		D 6-4	+++		A 21-3	+++	
C 8-4	+					A 21-4	+	
C 10-3	+++							
C 11-1	+++							
C 11-3	+++							

3.3.6.3 Solubilização do fosfato inorgânico

A capacidade de solubilizar o fosfato inorgânico caracteriza-se pela formação de um halo transparente em volta das colônias. A maioria dos isolados não tem capacidade de solubilizar o fosfato. No entanto, nos isolados C 3-4, C 5-4, A 8-1 e A 18-1 foi possível observar a presença do halo transparente em volta das colônias (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 – Capacidade de solubilizar o fosfato inorgânico pelos isolados de *R. leguminosarum* bv *trifolii*; (+) presença halo (-) ausência de halo.

Solubilização fosfato		Solubilização fosfato		Solubilização fosfato	
C 1-1	-	D 1-2	-	A 6-1	-
C 1-2	-	D 1-3	-	A 8-1	+
C 1-3	-	D 1-4	-	A 10-3	-
C 1-4	-	D 2-1	-	A 14-2	-
C 2-1	-	D 2-2	-	A 16-2	-
C 2-2	-	D 2-4	-	A 17-3	-
C 3-1	-	D 3-1	-	A 18-1	+
C 3-2	-	D 3-2	-	A 18-2	-
C 3-4	+	D 6-2	-	A 18-4	-
C 5-4	+	D 6-4	-	A 21-3	-
C 8-4	-			A 21-4	-
C 10-3	-				
C 11-1	-				
C 11-3	-				

3.4 Discussão

3.4.1 Influência dos factores ambientais na sobrevivência do rizóbio

A sobrevivência das estirpes de *Rhizobium* nos solos pode ser afectada por vários factores ambientais dos quais se destacam o pH e a contaminação por metais pesados (Brockwell et al., 1991; Graham et al., 1982, 1994; Zahran, 1999), assim como pela presença/ausência da planta hospedeira nos solos (Giller et al., 1993; Ibekwe et al., 1997). A dimensão da população indígena de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* no solo BC foi de $4,24 \times 10^4$ bactérias g⁻¹ de solo. Em contraste, as populações indígenas dos locais mais contaminados foram significativamente mais reduzidas. No solo BD o número de rizóbios determinado foi de 9,1 bactérias g⁻¹ de solo e em BA foi de apenas de 7,3 bactérias g⁻¹ de solo. A reduzida dimensão das populações indígenas de rizóbio nos solos BD e BA está relacionada com a elevada contaminação por metais pesados verificada nestes solos, cujas concentrações ultrapassaram largamente os limites impostos por lei (Tabela 2.4 – Capítulo 2). Vários autores têm mostrado a reduzida sobrevivência do rizóbio em solos contaminados com metais pesados (Chaudri et al., 1993a; Chaudri et al., 2000; Giller et al., 1998; Giller et al., 1993; Lakazian et al., 2002; McGrath et al., 1988; Obbard et al., 1993). Por outro lado, a sobrevivência do rizóbio também pode ser influenciada pelo pH. Segundo Richardson e Simpson (1988) a sobrevivência de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* pode ser afectada em solos com pH < 5,5, com severa redução do seu número a pH < 4,5 (Hirsch, 1996). De facto, todos os solos apresentaram um pH < 5,5. No solo controlo (BC) e no solo medianamente contaminado (BD) registaram-se valores de pH iguais a 5,08 e a 5,21, respectivamente, enquanto no solo mais contaminado (BA) o valor de pH foi igual a 4,15 (Tabela 2.2 – Capítulo 2). O pH ácido dos solos em estudo contribuiu para o aumento da biodisponibilidade dos metais pesados e consequente aumento da toxicidade dos iões metálicos para o rizóbio. No entanto, o pH por si só não parece ter afectado a sobrevivência do rizóbio no solo BD. Tal facto foi comprovado pela diferença significativa na dimensão das populações dos solos BC ($4,24 \times 10^4$ bactérias g⁻¹ de solo) e BD (9,1 bactérias g⁻¹ de solo) que têm pH similares, reforçando a influência dos metais na sobrevivência do rizóbio.

O pH e a concentração de metais influenciam não só a sobrevivência do rizóbio no solo como também a nodulação e a fixação de azoto (Ibekwe et al., 1995, 1997; McGrath et al., 1988). Segundo Graham (1992) e Hungria e Vargas (2000) o pH ácido afecta a troca de sinais moleculares entre o rizóbio e o seu hospedeiro podendo inibir a nodulação e consequentemente a fixação de azoto. Ibekwe et al. (1995) também mostraram que em condições de pH ácido, o número de rizóbios no solo foi reduzido, assim como o número de nódulos formados nas plantas hospedeiras.

A distribuição das estirpes de rizóbio nos solos também é influenciada pela presença da planta hospedeira. Esta confere protecção à população rizobiana levando ao aumento do número de rizóbios nos solos (Giller et al., 1993; Hirsch, 1996; Hirsch et al., 1993). No momento da amostragem existiam plantas de trevo branco a crescer no solo BC, contrariamente ao verificado nos solos contaminados. Este facto pode justificar a maior dimensão da população indígena de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* registada neste local, face a BD e a BA, além do facto das concentrações de metais em BC serem significativamente mais baixas e o pH menos ácido. Nos solos contaminados, a presença da planta hospedeira reveste-se de maior importância e tem sido apontada como a principal razão para o sucesso da nodulação e fixação de N₂. Obbard e Jones (1993) mostraram que a presença da planta hospedeira em solos contaminados, independentemente das concentrações de metais, leva à presença de células eficazes, quer nos nódulos da planta hospedeira quer na sua rizosfera. Estes rizóbios foram capazes de fixar N₂, mesmo nos locais onde as concentrações de metais excediam largamente os limites máximos permitidos por lei.

3.4.2 Isolamento do rizóbio e autenticidade

O isolamento do *Rhizobium* dos diferentes solos (BC, BD e BA) foi realizado usando o trevo branco como planta armadilha. Após 8 semanas os nódulos foram excisados e o rizóbio isolado. Os nódulos provenientes das plantas de trevo crescidas no solo BC apresentaram, na sua maioria, cor rosa e tamanho superior a 3 mm, enquanto os nódulos das plantas crescidas nos solos contaminados BD e BA eram, na sua maioria, brancos e de tamanho reduzido (1-2 mm) (Tabela 3.1). Resultados similares foram obtidos por

Chaudbary et al. (2004) e Hirsch et al. (1993) ao isolarem rizóbio de solos contaminados com metais pesados. Adicionalmente, McGrath et al. (1995) mostraram que os nódulos rosa e de tamanho superior a 3 mm são eficazes enquanto os nódulos brancos e de tamanho reduzido são considerados ineficazes.

Para confirmar a autenticidade dos isolados realizou-se um teste de nodulação usando o trevo branco como planta hospedeira. A maioria dos isolados do solo BC e BD nodularam as plantas de trevo, contrariamente ao verificado para os isolados do solo BA que não conseguiram nodular a planta hospedeira. Este resultado não era esperado uma vez que os diferentes isolados foram obtidos através da introdução da planta hospedeira nos solos e consequente isolamento a partir dos nódulos radiculares formados. Os genes *nodA*, *nodB* e *nodC*, são considerados essenciais à nodulação, uma vez que os mutantes num destes três genes apresentam o fenótipo Nod⁻ (Marvel et al., 1985). Por esse motivo, procedeu-se à análise do gene *nodC* de forma a confirmar os resultados do teste de nodulação.

Segundo Laguerre et al. (2001) e Ueda et al. (1995) a amplificação por PCR do gene *nodC* dá origem a uma banda de 930 pb quando presente. Carrasco et al. (2005) e Kumar et al. (2006) também verificaram a amplificação de uma banda de aproximadamente 500 pb nas estirpes que nodularam as plantas hospedeiras. De um modo geral, em todos os isolados do solo BC foram encontradas as bandas de 930 e 500 pb (Figura 3.2), confirmando os resultados obtidos no teste de nodulação (Tabela 3.2) e a sua autenticidade como bactérias pertencentes ao género *Rhizobium*. A maioria dos isolados do solo BD apresentou unicamente a banda de 500 pb, o que também confirma a sua autenticidade (Figura 3.3). No entanto, os isolados D 1-3 e D 1-4 não possuem o gene *nodC* nem nodularam as plantas de trevo, o que compromete a sua autenticidade. Curiosamente, estas duas estirpes foram isoladas do mesmo nódulo que a estirpe D 1-2 que nodulou o trevo e apresentou a banda de 500 pb referente ao gene *nodC*. De facto, alguns estudos apontam para a possibilidade dos nódulos poderem ser colonizados por mais do que uma espécie bacteriana (de Lajudie et al., 1999; Liu et al., 2007; Mhamdi et al., 2006). Vários autores verificaram a coexistência de estirpes de rizóbio e de *Agrobacterium* nos nódulos radiculares de feijão e de outras leguminosas. As justificações

mais plausíveis para este acontecimento prenderam-se com a aquisição dos genes simbióticos através da transferência horizontal ou pelo aproveitamento do canal de infecção por estas estirpes de *Agrobacterium*. Ao realizarem testes de nodulação estes autores verificaram que estas estirpes perderam a capacidade de nodular a planta hospedeira, sugerindo que apenas são capazes de infectar nódulos pré-formados (de Lajudie et al., 1999; Hameed et al., 2004; Liu et al., 2007; Mhamdi et al., 2002; Mrabet et al., 2006). Vários autores sugerem ainda que a perda de capacidade de nodular a planta hospedeira poderá estar relacionada com a instabilidade dos genes simbióticos adquiridos por transferência horizontal que podem ser perdidos durante o isolamento e o processo de preservação (de Lajudie et al., 1999; Mhamdi et al., 2002).

Relativamente aos isolados A os resultados do teste de nodulação foram confirmados pela análise do gene *nodC*, uma vez que as bandas esperadas não foram encontradas em nenhum dos isolados deste solo (Figura 3.4). Com o objectivo de confirmar a autenticidade de alguns dos isolados procedeu-se à sequenciação do gene 16S rDNA (Tabela 3.3). O isolado A 10-3 apresentou uma percentagem de similaridade de 99% com a estirpe de referência *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325. Embora este isolado tenha perdido a capacidade de nodular a planta hospedeira, perante esta percentagem de homologia consideramos este isolado como *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Estes resultados sugerem que o isolado A 10-3 perdeu a capacidade de nodular após ter permanecido em meio artificial no laboratório. De facto, alguns autores referem a existência de instabilidade genómica em estirpes mantidas em laboratório (Shamseldin et al., 2005). Esta instabilidade caracteriza-se por rearranjos nos plasmídeos ou até mesmo pela perda do plasmídeo simbiótico. Este é de extrema importância uma vez que contém os genes que codificam para a nitrogenase e para a especificidade da nodulação, podendo alterar a capacidade simbiótica dos isolados. De facto, a maioria dos isolados A não tem plasmídeos (Tabela 4.2 e Figura 4.2 - Capítulo 4) podendo-se assim justificar a perda de capacidade de nodulação observada. Segundo Brom et al. (1991) cerca de 2% das estirpes mantidas em laboratório perdem o plasmídeo simbiótico. Shamseldin et al. (2005) obtiveram resultados similares para alguns isolados de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*.

O isolado A 18-4 apresentou uma similaridade de apenas 83% com o organismo de referência, sugerindo tratar-se de uma bactéria pertencente a outro género que não o género *Rhizobium*. Assim, após comparação com a base de dados observamos uma percentagem de similaridade de 99% com o organismo de referência *Burkholderia xenovorans* LB 400. Este resultado deixa em aberto a possibilidade de espécies de *Burkholderia* conseguirem nodular o trevo branco. Villarreal e Caballero (2010) demonstram que existem bactérias do género *Burkholderia* que nodulam leguminosas, em particular o feijão. Essas bactérias pertencentes à classe das β -Proteobacteria foram, inicialmente, encontradas em associação com plantas de milho e café e, de acordo com perfis de restrição e sequências do gene 16S rDNA, estão intimamente relacionadas com espécies fixadoras de azoto.

O isolado A 17-3 apresentou uma percentagem de similaridade com o organismo de referência de 93%, no entanto o fragmento sequenciado tem um tamanho reduzido (240 pb) o que não permitiu tirar conclusões significativas.

3.4.3 Capacidade simbiótica

A determinação do peso seco da parte aérea das plantas de trevo branco inoculadas com os isolados de rizóbio permitiu-nos avaliar a sua capacidade de fixar azoto. Os ensaios para estimar a capacidade simbiótica realizados em meio de Jensen mostraram que os isolados provenientes do solo BC foram mais eficazes que os dos solos mais contaminados BD e BA (Figuras 3.8 e 3.9). Resultados similares foram obtidos por Castro et al. (1997) que verificaram que os isolados provenientes de locais contaminados com metais são menos eficazes do que os isolados dos locais não contaminados. Os isolados C 1-2, C 1-4, C 2-1 e C 3-2 foram considerados eficazes uma vez que o índice ESR foi superior a 17% (Figura 3.8). Pelo contrário, os isolados provenientes do local BD foram ineficazes com excepção do isolado D 2-2, que apresentou um índice ESR de 35%. Obbard et al. (1993) também encontraram estirpes eficazes em solos contaminados mas apenas em solos onde o trevo era indígena. Tal como foi referido anteriormente, no local BD não existia trevo ou outra leguminosa a crescer, eliminando a possibilidade de protecção do rizóbio pela planta hospedeira. Assim, o facto do isolado D 2-2 conseguir nodular e fixar

azoto poderá estar relacionado com a protecção física adquirida por ligação a partículas argilosas ou pela sua permanência em microporos do solo, onde as concentrações activas de metais eram mais baixas. Segundo Ibekwe et al. (1997) existem nichos no solo onde as concentrações de metais são mínimas, providenciando locais de protecção para bactérias como o rizóbio. Estes nichos estão presentes mesmo em locais extremamente contaminados. Smith e Giller (1992) também isolaram estirpes eficazes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* de locais muito contaminados com metais pesados na ausência do trevo.

A ineficácia da maioria dos isolados do solo BD também pode ser justificada pelo tamanho reduzido da população indígena de rizóbio presente neste solo. Segundo Giller et al. (1989) quando os solos contaminados com metais foram inoculados com estirpes de rizóbio eficazes e o trevo semeado imediatamente, as plantas foram noduladas eficazmente. Contudo, quando os solos foram inoculados e o trevo semeado após 2 meses, verificou-se a formação de nódulos ineficazes a não ser que o inóculo fosse superior a 10^7 células g^{-1} de solo. Estes resultados demonstraram que as concentrações de metais presentes nos solos foram suficientes para impedir a existência de rizóbios eficazes em vida livre evidenciando a importância do tamanho da população bacteriana no solo.

3.4.4 Substâncias promotoras do crescimento vegetal (SPCV)

As bactérias fixadoras de azoto promovem o crescimento vegetal fornecendo azoto às plantas. Adicionalmente, em vida livre estas bactérias podem aumentar o crescimento das leguminosas através da produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal (SPCV). No entanto, além da capacidade em produzir as SPCV as bactérias devem ser competitivas e capazes de colonizar e sobreviver na rizosfera. Infelizmente, a interacção entre as rizobactérias promotoras e as plantas pode ser instável e os bons resultados obtidos *in vitro* nem sempre podem ser reproduzidos no campo, uma vez que estão dependentes das condições ambientais e da competição com microrganismos indígenas (Zhender et al., 1999). Assim, torna-se importante estudar estirpes que estejam bem adaptadas às condições adversas dos solos de modo a utilizá-

las mais tarde no campo. Deste modo, neste estudo avaliou-se a capacidade de produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal das diferentes estirpes isoladas dos solos da Mina do Braçal.

Todos os isolados testados produziram IAA (Figura 3.10, 3.11 e 3.12) na presença de diferentes concentrações de L-triptofano (100 e 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$). No entanto, na ausência de TPF nenhum dos isolados produziu IAA. Este resultado tem um impacto prático, uma vez que não é suficiente as rizobactérias produzirem IAA, também é necessário que o seu precursor (L-triptofano) esteja presente nos solos (Arshad e Frankenberger, 1993). Geralmente, a quantidade de IAA produzida pelas bactérias aumenta concomitantemente com o aumento da concentração de TPF no meio de crescimento (Ahmad et al., 2008; Duhan et al., 1998; Wani et al., 2007a). Tal facto apenas foi confirmado para alguns isolados C, não se tendo verificado para os isolados provenientes dos locais mais contaminados. Estes resultados sugerem que os isolados D e A têm menor capacidade de produzir IAA. No entanto, o isolado D 2-1 produziu quantidades de IAA muito semelhantes às produzidas pelos isolados C (Figura 3.11). A existência de estirpes com capacidade de produzir concentrações elevadas de IAA e que simultaneamente estão bem adaptadas a condições ambientais adversas nos solos, como o pH ácido e elevada contaminação por metais pesados, reveste-se de grande importância. Estas estirpes poderão ser utilizadas em solos contaminados para ajudar a promover o crescimento quer de plantas de leguminosas quer de plantas não leguminosas. Segundo Wani et al. (2007b) a aplicação de estirpes de *Bradyrhizobium* como bioinoculante aumentou a tolerância das plantas ao zinco e níquel e através da sua capacidade em produzir SPCV promoveram o seu crescimento. Resultados similares foram obtidos por Faisal e Hasnain (2005). Vários autores também comprovaram a capacidade de estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* em promoverem o crescimento de plantas não leguminosas devido à produção de IAA (Antoun et al., 1998; Höflich et al., 1994; Noel et al., 1996; Yanni et al., 1995).

A produção de sideróforos pelas rizobactérias é uma característica que pode afectar indirectamente o crescimento vegetal. Os sideróforos ligam o ferro (Fe^{3+}) disponível no solo tornando-o indisponível para os organismos fitopatogénicos (Ahmad et

al., 2008). A maioria dos isolados testados (94%) mostrou capacidade de produzir sideróforos independentemente do seu local de origem (Tabela 3.4). De acordo com Antoun et al. (1998) a maioria dos isolados de rizóbio produz sideróforos e IAA. Esta característica é mais evidente nas bactérias isoladas de nódulos do que em outras rizobactérias.

O facto do fósforo ser um elemento essencial ao crescimento vegetal e estar pouco disponível nos solos aumenta a relevância das rizobactérias solubilizadoras do fosfato inorgânico. Estas bactérias solubilizam o fosfato através da libertação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (Bano e Mussarat, 2003; Kim et al., 1997). Neste estudo, a capacidade de solubilizar o fosfato foi avaliada através da formação de um halo transparente à volta das colónias. A maioria dos isolados testados não tem capacidade de solubilizar o fosfato (Tabela 3.5), com excepção dos isolados C 3-4, C 5-4, A 8-1 e A 18-1. Antoun et al. (1998) verificaram que a frequência de estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* capazes de solubilizar o fosfato é reduzida (2-5%) ao contrário das estirpes de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *phaseoli* e *Sinorhizobium meliloti* onde 67-84% das estirpes solubilizaram fosfato.

Capítulo 4

Diversidade da população natural de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

4.1 Introdução

O estudo da diversidade de populações naturais de bactérias pode fornecer informações importantes acerca de genótipos que estão bem adaptados a determinadas condições de stresse (Young, 1994). Por outro lado, a inoculação de leguminosas com estirpes eficazes e bem adaptadas ao meio ambiente tem uma elevada importância do ponto de vista ecológico e económico (Stephens e Rask, 2000). Assim, o estudo da diversidade das populações indígenas de rizóbio provenientes de solos sujeitos a stresses ambientais reveste-se de grande importância.

Vários estudos têm sido realizados com o objectivo de perceber quais as alterações que os metais pesados provocam na diversidade das populações bacterianas, em particular ao nível das bactérias fixadoras de azoto (Castro et al., 1997; Delorme et al., 2003; Hirsch et al., 1993; Laguerre et al., 2006; Lakzian et al., 2002). Segundo Atlas (1984) em solos contaminados com metais pesados a diversidade microbiana tende a diminuir em termos de riqueza de espécies. Esta diminuição poderá estar relacionada com a extinção das espécies menos tolerantes aos metais e/ou com o enriquecimento das espécies bem adaptadas. Giller et al. (1989) estudaram uma população de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* proveniente de solos contaminados com metais pesados em resultado da aplicação de lamas residuais durante 20 anos, analisando a eficácia na fixação de azoto e o perfil plasmídico dos isolados. Estes autores verificaram que as

estirpes perderam a capacidade de formar associações eficazes com o trevo branco, mesmo na ausência de metais. Adicionalmente, os isolados ineficazes apresentaram o mesmo perfil plasmídico, indicando a existência de um único genótipo nos solos contaminados. Esta reduzida diversidade foi comprovada mais tarde por Hirsch et al. (1993) ao analisarem perfis de restrição (RFLP) dos mesmos isolados. Por outro lado, Ibekwe et al. (1997), utilizando outra técnica molecular REP-PCR, estudaram a diversidade genética da população rizobiana proveniente de solos aos quais também foram aplicadas lamas residuais. A diversidade genética desta população foi elevada e similar à encontrada nos solos não contaminados. Resultados similares foram obtidos por Delorme et al. (2003) que utilizaram a técnica BOX-PCR para avaliar a diversidade de populações de rizóbio sujeitas à acção prolongada de metais pesados, tendo concluído que a diversidade foi mais elevada nos solos mais contaminados.

O estudo da diversidade das populações de rizóbio pode ser realizado através de abordagens fenotípicas ou moleculares. Os métodos fenotípicos incluem testes de assimilação, bioquímicos e enzimáticos (de Lajudie et al., 1994) e padrões de resistência intrínseca a antibióticos (Abaidoo et al., 2002), enquanto que os moleculares baseiam-se na análise de ácidos nucleicos e proteínas (de Lajudie et al., 1994; Dupuy et al., 1994).

Como referido anteriormente, a análise dos perfis plasmídicos através do método de lise *in situ* (Eckhardt, 1978) também é uma técnica de *fingerprinting* muito utilizada no estudo da diversidade genética de populações naturais de rizóbio (Handley et al., 1998; Lakzian et al., 2008; Laranjo et al., 2001; Vessey et al., 2006), possuindo um poder de discriminação semelhante à análise de restrição do DNA total (Laguerre et al., 1992). Em rizóbio, esta técnica reveste-se de grande importância uma vez que o seu genoma é constituído, na maioria dos casos, por vários plasmídeos de elevadas dimensões (Brom et al., 1992).

Adicionalmente, vários métodos baseados na técnica de PCR têm sido propostos para avaliar a diversidade do rizóbio, permitindo nalguns casos diferenciar estirpes próximas (Tan et al., 2001). Dentro desses métodos temos: a amplificação aleatória de fragmentos do genoma (RAPD), a sequenciação directa dos genes 16S rRNA (Both et al., 1991; Eardly et al., 1992; Oyaizu et al., 1992; Young et al., 1991) e a análise de perfis de

restrição (RFLP) (Laguerre et al., 1994). Uma característica importante do genoma de *Rhizobium* é a presença de elementos repetitivos e conservados difundidos no DNA (Hughes, 2000). Estas sequências encontram-se em locais característicos do genoma e, quando amplificados por PCR, geram marcadores moleculares e genómicos altamente específicos (Rademaker et al., 1998). As reacções de amplificação do DNA com *primers* REP (Repetitive enterogenic palindromic) e ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) são bons exemplos e têm sido vastamente usadas como *fingerprinting* de um elevado número de bactérias Gram-negativas (Versalovic et al., 2001) incluindo o *Rhizobium*, permitindo diferenciar espécies e estirpes com elevada precisão (de Bruijn, 1992).

Dentro da abordagem molecular destacam-se ainda os perfis electroforéticos de proteínas totais e de lipopolissacarídeos. De facto, os padrões electroforéticos de proteínas totais têm fornecido informações relevantes em estudos de caracterização e taxonomia de espécies bacterianas, pois a expressão do genoma microbiano resulta na síntese de um elevado número de proteínas (Jackman, 1985). A sequenciação do genoma de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325, revelou a existência de mais de 4500 proteínas (US DOE Joint Genome Institute). A técnica de separação por electroforese (SDS-PAGE) de proteínas totais tem sido amplamente utilizada no estudo da diversidade de rizóbio (Alexandre et al., 2006; Lima et al., 2005) e alguns autores já utilizaram este método para a identificação de novas espécies (Moreira et al., 2000). Adicionalmente, o perfil de lipopolissacarídeos é único para cada bactéria, constituindo igualmente uma boa ferramenta para avaliar a diversidade das populações de rizóbio.

Neste contexto, este capítulo teve como principais objectivos:

- Determinar a diversidade das populações indígenas de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* isoladas dos diferentes locais (BC, BD, BA) da mina do Braçal, através da análise dos perfis de plasmídeos e das técnicas de REP-PCR e ERIC-PCR;
- Determinar a diversidade das populações indígenas de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* recorrendo à análise dos perfis de proteínas e de lipopolissacarídeos;

- Analisar a relação entre a diversidade e a contaminação por metais pesados do local de origem;

- Analisar a relação entre a diversidade das populações e a capacidade simbiótica dos isolados.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material Biológico

Os isolados de rizóbio utilizados para estudar a diversidade são os descritos na Tabela 3.1 – Capítulo 3. Utilizou-se a estirpe de referência 32 TslA de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, obtida da colecção do Laboratório de Microbiologia do Instituto Nacional de Recursos Biológicos para estimar os pesos moleculares dos plasmídeos (Castro et al., 2003).

4.2.2 Análise de DNA-plasmídico

A análise dos perfis plasmídicos foi realizada recorrendo-se a electroforese horizontal em gel de agarose, utilizando o método de lise *in situ*. Esta técnica tem como particularidade o uso de lisozima e de SDS. A lise das células é um passo muito importante nesta técnica, assim a pré-lavagem das células com uma solução diluída de sarcosil (0,1%) facilita o acesso da lisozima às paredes das células de *Rhizobium* aumentando a eficiência da lise. A concentração de agarose usada na preparação dos géis deve formar uma malha molecular que permita a migração dos plasmídeos superenrolados (CCC) e de pequenos fragmentos de DNA através do gel.

4.2.2.1 Preparação das amostras

Todas as culturas foram mantidas em meio AML a 4 °C foram repicadas para meio TY sólido e incubadas 3 dias a 28 °C. Em seguida, retirou-se uma pequena ansada para tubos com 5 ml de meio TY líquido e incubaram-se a 28 °C, com agitação a 100 rpm até atingir a fase exponencial. Transferiu-se entre 1-1,5 ml de cultura para microtubos e recolheram-se as células por centrifugação a 14000 g durante 10 min a 4 °C. O sedimento foi ressuspenso em 1 ml de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) com 0,1% (m/v) de sarcosil e novamente centrifugado. Em seguida realizaram-se duas lavagens com tampão TE. De seguida as células foram ressuspendidas em 55 µl de solução de lise com a

seguinte constituição: 25% (m/v) sacarose em 25 mM Tris-HCl pH 8, 1 mg ml⁻¹ de lisozima, 1 U ml⁻¹ de RNase e uma gota de xilenocianol.

4.2.2.2 Electroforese

A electroforese horizontal em gel de agarose a 0,6% (m/v) em tampão TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico e 2,5 mM EDTA, pH 8,3) foi realizada numa tina da Alfagene com a dimensão de gel de 200 mm x 200 mm x 4 mm. Nesta técnica utilizou-se um pente duplo, sendo o primeiro pente constituído por um único poço que ocupa a largura toda do gel e que foi preenchido com uma mistura de 0,4% (m/v) agarose em TBE, 2% (m/v) SDS e uma gota de azul de bromofenol. O segundo pente, distanciado 1 cm do primeiro é constituído por 11 poços onde foram colocadas as amostras de *Rhizobium* previamente tratadas (4.2.2.1). A electroforese foi realizada em tampão TBE durante 16-18 h a 4 °C, à voltagem constante de 20 V durante as primeiras 3 h e de 120 V nas seguintes.

Os géis foram corados numa solução de brometo de etídio a 0,5 µg ml⁻¹ durante 15 min.

4.2.2.4 Estimativa dos pesos moleculares

Os pesos moleculares dos plasmídeos dos isolados de *Rhizobium* foram estimados por comparação com os pesos moleculares da estirpe de referência 32 TslA (Castro et al., 2003). Os géis foram digitalizados no densitómetro (Densitometer FX, Bio-Rad) e para a determinação dos pesos moleculares utilizou-se o programa Quantity-One, Bio-Rad. Para cada isolado os perfis obtidos foram analisados através do sistema binário de bandas presentes (1) e ausentes (0). A matriz de semelhança foi construída usando o programa FreeTree (Pavlicek et al., 1999). Os dendogramas foram construídos utilizando o algoritmo de agrupamento UPGMA e o coeficiente de Dice (Li, 1997).

4.2.3 REP-PCR e ERIC-PCR

A análise da diversidade genética foi efectuada com base em sequências altamente conservadas. Estas sequências são conhecidas por sequências REP (Repetitive extragenic palindromic) e sequências ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic

Consensus Sequences). O uso de *primers* para estas zonas na reacção de PCR conduz a uma amplificação selectiva de regiões genómicas distintas localizadas entre os elementos REP e ERIC. Os fragmentos amplificados dão origem a um perfil que permite diferenciar genomas bacterianos (de Bruijn, 1992).

4.2.3.1 Preparação das amostras

As culturas de *Rhizobium* mantidas em AML a 4 °C foram repicadas para placas contendo meio TY (Beringer et al., 1984) e mantidas durante 3 dias a 28 °C. De seguida, retirou-se uma ansada de cada isolado e inocularam-se tubos de 5 ml contendo TY líquido. Os tubos foram incubados a 28 °C, com agitação a 150 rpm, até à fase exponencial de crescimento. Transferiu-se 1 a 1,5 ml de cada cultura para microtubos e as células foram recolhidas após centrifugação a 8000 g, durante 5 min a 4 °C.

4.2.3.2 Extracção do DNA bacteriano total

A extracção de DNA total foi realizada de acordo com Vogelstein e Gillespie (1979) usando o Kit *NucleoSpin* Tissue. Para o processamento das amostras seguiu-se as especificações do protocolo que acompanha o Kit. O procedimento de extracção detalhado encontra-se descrito em 3.2.5.2.

4.2.3.3 REP-PCR

As sequências de *primers* utilizadas foram as seguintes: REP1 (*Forward*) - 5'TTTTCGTCGTCATCTGGC3' e REP2 (*Reverse*) – 5'TCGTCTTATCTGGCCTAC3' (Versalovic et al., 1991). Nas reacções de PCR utilizou-se o Kit-Master Mix Quiagen (Taq polimerase, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada DNTP). As reacções foram realizadas para um volume de 20 µl e a mistura de reacção continha: 15,8 µl de MasterMix, 1 µl de *primer* REP1 (10 pmol µl⁻¹), 1 µl de *primer* REP2 (10 pmol µl⁻¹), 1 µl de DMSO, 0,2 µl de BSA e 1 µl de DNA.

As reacções de PCR foram realizadas num termociclador Eppendorf MasterCycle com as seguintes condições: 2 min de desnaturação inicial a 95 °C, seguidos de 30 ciclos de desnaturação 30 seg a 94 °C, emparelhamento 1 min a 40 °C e extensão de 8 min a 65 °C. A reacção de PCR foi finalizada com uma extensão final de 10 min a 65 °C.

Os produtos obtidos foram analisados num gel de agarose a 1% (m/v) em TBE utilizando uma voltagem de 70 V durante 30 min e 4 h com voltagem de 80 V. Utilizou-se um marcador de 1 kb (*Gene Ruler*TM 1 kb DNA Ladder - Fermentas).

O gel foi corado numa solução de brometo de etídio a 0,5 µg ml⁻¹ durante 15 min.

4.2.3.4 ERIC-PCR

As sequências de *primers* utilizadas foram as seguintes: ERIC1 (*Forward*) - 5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3') ERIC2 (*Reverse*) – 5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG3' (Versalovic et al., 1991).

Nas reacções de PCR utilizou-se o Kit-Master Mix Quiagen (Taq polimerase, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada DNTTP). As reacções foram realizadas para um volume de 20 µl e a mistura de reacção continha: 15,8 µl de MasterMix, 1 µl *primer* ERIC1 (10 pmol µl⁻¹), 1 µl de *primer* ERIC2 (10 pmol µl⁻¹), 1 µl de DMSO, 0,2 µl de BSA e 1 µl de DNA.

As reacções de PCR foram realizadas num termociclador Eppendorf MasterCycle com as seguintes condições: 2 min de desnaturação inicial a 95 °C, seguidos de 35 ciclos de desnaturação 30 seg a 94 °C, emparelhamento 1 min a 50 °C e extensão de 8 min a 65 °C. A reacção de PCR foi finalizada com uma extensão final de 8 min a 65 °C.

Os produtos obtidos foram analisados num gel de agarose a 1% (m/v) em TBE utilizando uma voltagem 70 V durante 30 min e 4 h com voltagem de 80 V. Utilizou-se um marcador de 1 kb (*Gene Ruler*TM 1 kb DNA Ladder - Fermentas).

O gel foi corado numa solução de brometo de etídio a 0,5 µg ml⁻¹ durante 15 min.

4.2.3.4 Tratamento dos resultados

Os géis foram digitalizados no densitómetro (Densitometer FX, Bio-Rad) e utilizou-se o programa Quantity-One, Bio-Rad para marcar as bandas. Para cada isolado os perfis obtidos por ERIC e REP foram analisados através do sistema binário de bandas presentes (1) e ausentes (0). A matriz de semelhança foi construída usando o programa FreeTree (Pavlicek et al., 1999). Os dendogramas foram construídos utilizando o algoritmo de agrupamento UPGMA e o coeficiente de Dice (Li, 1997).

4.2.4 Proteínas totais

4.2.4.1 Preparação das amostras

Os extractos celulares foram ressuspensos em 300 µl de 100 mM tampão fosfato de potássio pH 7, 1 mM EDTA e homogeneizados com uma sonda de ultrassons em gelo em 2 ciclos de 15 seg (0,7 ciclos seg^{-1} ; 50% amplitude). A suspensão final foi centrifugada a 10000 g durante 15 min a 4 °C e o sobrenadante guardado a -80 °C para posterior utilização.

A quantidade de proteína presente em cada amostra foi quantificada usando o método de Bradford (Bradford, 1976).

As amostras foram preparadas em 50 µl tampão da amostra 2 vezes concentrado (125 mM Tris-HCl pH 8,3, 20% (v/v) glicerol a 87%, 4% (m/v) SDS, 0,002% (m/v) azul de bromofenol, 10% DTT) (Laemmli, 1970) e incubadas a 100 °C durante 5 min.

4.2.4.2 Electroforese

Para a análise das proteínas totais carregaram-se 10 µg de proteína em cada poço de géis de poliacrilamida usando o SDS como desnaturante (SDS-PAGE). Utilizou-se um gel de separação a 12,5% (40% acrilamida:bisacrilamida (37:1 Sigma), 375 mM Tris-HCl pH 8,85, 0,1% (m/v) SDS) e um gel de empacotamento 4% (40% acrilamida:bisacrilamida (37:1 Sigma), 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% (m/v) SDS). A polimerização dos géis foi iniciada com 0,1% TEMED e 0,1% (m/v) de persulfato de amónio. A electroforese foi efectuada a 4 °C com voltagem constante de 40 mA (20 mA por cada gel) em tampão de corrida (192 mM glicina, 25 mM Tris-HCl, 0,1% (m/v) SDS) tendo-se utilizado um padrão com proteínas de peso molecular compreendido entre 6,8 e 210 KDa (Prestained SDS-PAGE standards, Bio-Rad).

4.2.4.3 Coloração

Os géis foram corados numa solução de Coomassie Blue R (40% (v/v) metanol, 7% (v/v) ácido acético, 0,025% (m/v) Coomassie Blue R-250) durante 2 h com agitação de 100 rpm. Em seguida os géis foram colocados numa solução de descoloração (7% (v/v) ácido acético, 5% (v/v) metanol) até o contraste das bandas com o fundo do gel ser máximo.

4.2.4.5 Tratamento dos resultados

Os géis foram digitalizados no densitómetro (Densitometer G-710, Bio-Rad) e utilizou-se o programa Quantity-One, Bio-Rad para marcar as bandas. Para cada isolado os perfis proteicos obtidos foram analisados através do sistema binário de bandas presentes (1) e ausentes (0). A matriz de semelhança foi construída usando o programa FreeTree (Pavlicek et al., 1999). Os dendogramas foram construídos utilizando o algoritmo de agrupamento UPGMA e o coeficiente de Dice (Li, 1997).

4.2.5 Lipopolissacarídeos (LPS)

4.2.5.1 Preparação das amostras

Os diferentes isolados de *Rhizobium* foram colocadas a crescer em meio AML. As culturas foram incubadas com agitação (150 rpm) a 28 °C até atingirem uma densidade óptica de 1,0 (600 nm). As células foram centrifugadas a 10000 g a 4 °C durante 10 min e os extractos celulares lavados 2 vezes com 1 ml de água destilada e centrifugados novamente. Os sedimentos foram recolhidos por centrifugação e adicionou-se 50 µl de EDTA 100 mM ajustado a pH 7,0 com TEA (triethylamina). A suspensão foi misturada cuidadosamente e ficou a incubar durante 15 min à temperatura ambiente. Após incubação a mistura foi centrifugada 2 min a 14000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo ao qual se adicionou 30 µl de polimixina B (Affi-Prep, Bio-Rad). Após incubação à temperatura ambiente durante 15 min e sob agitação suave voltou-se a centrifugar a 14000 g durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 100 µl de uma solução de 100 mM KH₂PO₄ e 150 mM NaCl, pH 7. Após centrifugação a 14000 g o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 50 µl de tampão de amostra (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% (m/v) SDS, 20% (v/v) glicerol a 87%, 0,02% (m/v) de azul de bromofenol) (Tsai e Frasch, 1982). De seguida as amostras foram incubadas a 100 °C num banho, durante 5 min, sendo posteriormente colocadas num banho de ultrasons durante 15 min para dispersar os LPS (Valverde et al., 1997).

4.2.5.2 Electroforese

Os LPS presentes nas células de *Rhizobium* foram separados por electroforese vertical em géis de poliacrilamida utilizando SDS como desnaturante (SDS-PAGE). Utilizou-se um gel de separação a 15% (40% acrilamida:bisacrilamida (37:1 Sigma), 375 mM Tris-HCl pH 8,85) e um gel de empacotamento 4% (40% acrilamida:bisacrilamida (37:1 Sigma), 125 mM Tris-HCl pH 6,8). A polimerização dos géis foi iniciada com 0,1% (v/v) TEMED e 0,1% (m/v) de persulfato de amónio. A electroforese foi efectuada a 4 °C com voltagem constante de 40 mA (20 mA por cada gel) em tampão de corrida (192 mM glicina, 25 mM Tris-HCl, 0,1% (m/v) SDS) até que a frente do corante corresse 10 cm.

4.2.5.3 Coloração

A coloração dos LPS foi realizada de acordo com o método descrito por Tsai e Frasch (1982). Após a electroforese os géis foram colocados 16-18 h numa solução de 40% (v/v) etanol-5% (v/v) ácido acético. Posteriormente, os géis foram colocados numa solução de 0,7% (m/v) ácido periódico em 40% (v/v) etanol-5% (v/v) ácido acético, durante 5 min, após os quais se seguiram 3 lavagens em água destilada de 15 min cada. Os géis foram corados numa solução de prata durante 10 min com agitação (70 rpm) preparada de fresco com a seguinte composição: 2 ml hidróxido de amónia, 28 ml de 0,1 M de hidróxido de sódio e 5 ml de nitrato de prata a 20% (m/v), sendo o volume aferido a 150 ml com água destilada. De seguida efectuaram-se 3 lavagens com água destilada de 10 min cada. Por fim, colocaram-se os géis na solução de desenvolvimento (0,005% (m/v) ácido cítrico, 0,05% (v/v) formaldeído a 37%).

4.2.5.4 Tratamento dos resultados

Os géis foram digitalizados no densitómetro (Densitometer FX, Bio-Rad) e utilizou-se o programa Quantity-One, Bio-Rad para marcar as bandas. Para cada isolado os perfis de lipopolissacarídeos foram analisados através do sistema binário de bandas presentes (1) e ausentes (0). A matriz de semelhança foi construída usando o programa FreeTree (Pavlicek et al., 1999). Os dendogramas foram construídos utilizando o algoritmo de agrupamento UPGMA e o coeficiente de Dice (Li, 1997).

4.3 Resultados

4.3.1 Análise dos perfis plasmídicos dos isolados

Os 35 isolados submetidos à análise dos perfis de plasmídeos foram divididos em diferentes grupos consoante o número e o tamanho de plasmídeos. As dimensões dos plasmídeos foram determinadas por comparação com os 6 plasmídeos da estirpe de referência 32 TsIA cujas dimensões são as seguintes: 460, 430, 350, 260, 220 e 63 kb (Castro et al., 2003). Na Tabela 4.1 estão apresentados os pesos moleculares aproximados dos plasmídeos existentes nos diferentes grupos. No conjunto dos 35 isolados analisados foram encontradas 11 bandas que consoante a sua localização originaram 14 grupos (A a N). Os pesos moleculares dos plasmídeos variaram entre 669 e 56 kb.

Tabela 4.1 – Pesos moleculares (kb) aproximados dos plasmídeos existentes nos diferentes grupos. n.d. – não detectado.

Grupos	Peso molecular (kb)
A	462, 402, 368, 285, 204, 174, 144, 56
B	669, 285
C	507, 402, 368, 285, 255, 204, 174, 144, 56
D	402, 368, 255, 204
E	669, 507
F	174
G	144
H	204
I	669
J	462, 255, 204
K	255, 204
L	669, 462, 204
M	462, 204, 174
N	669, 225
O	n.d.

A frequência dos plasmídeos nos diferentes isolados variou significativamente. De acordo com a Figura 4.1 o plasmídeo com peso molecular de 204 kb foi o mais frequente, estando presente em 31% dos isolados analisados. O plasmídeo de maior peso molecular (669 kb) esteve presente em 29% dos isolados, enquanto o plasmídeo de menor peso molecular (56 kb) foi encontrado em apenas 9% dos isolados.

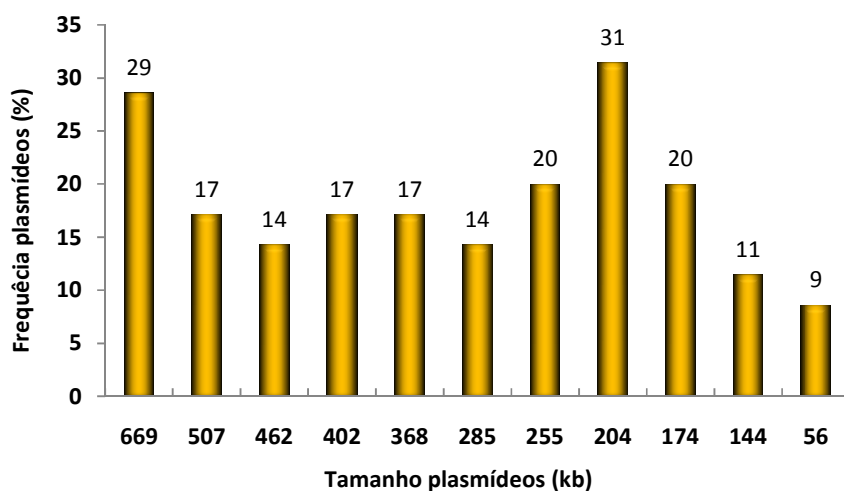


Figura 4.1 – Frequência dos diferentes plasmídeos nos 35 isolados analisados.

Na Figura 4.2 podemos observar exemplos representativos dos perfis de plasmídeos dos isolados originários dos diferentes solos (BC, BD e BA). Foi possível constatar a existência de plasmídeos com elevados pesos moleculares na maioria dos isolados. Por outro lado, o plasmídeo de 56 kb apenas foi encontrado em 3 isolados C (C 1-1, C1-2 e C 1-4) que apresentaram um número de plasmídeos igual ou superior a 8. Os isolados C apresentaram maior número de plasmídeos do que os isolados D. Na maioria dos isolados A não foram encontrados plasmídeos, com exceção dos isolados A 17-3 e A 21-3 que apresentaram 2 plasmídeos.

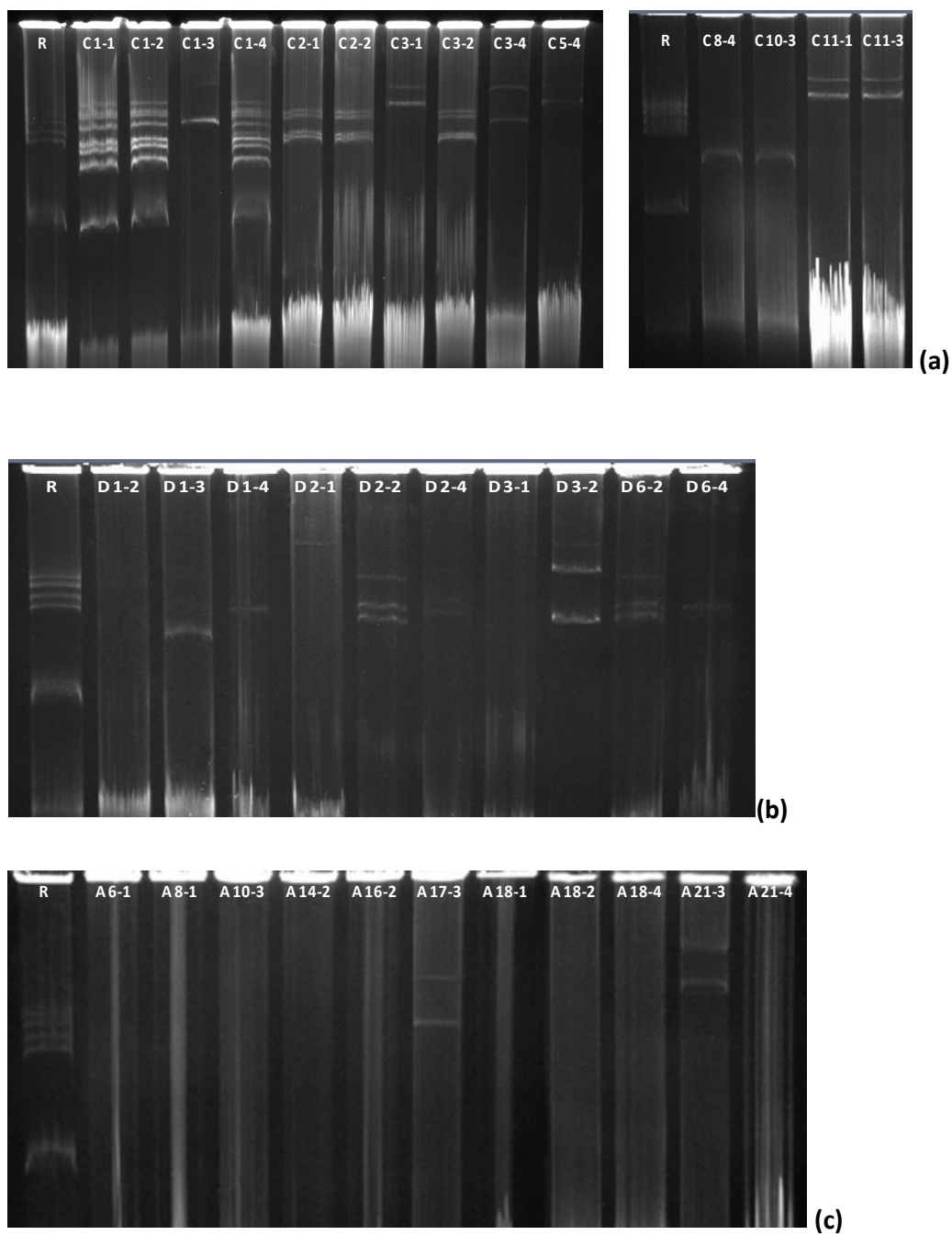


Figura 4.2 – Perfis de plasmídeos dos isolados provenientes do local BC (a), BD (b) e BA (c); R – estirpe de referência 32 TsIA.

Na Tabela 4.2 é possível observar a distribuição dos isolados C, D e A pelos diferentes grupos de plasmídeos. A análise da tabela permitiu verificar que os 14 isolados C foram distribuídos por 6 grupos (A a F), sendo os grupos D e E os mais frequentes uma vez que englobam 21,4 e 28,6%, respectivamente, dos isolados analisados. Embora os isolados D apresentassem menor número de plasmídeos a sua localização levou à distribuição dos 10 isolados em 9 grupos diferentes. Todos os grupos englobaram 10% dos isolados com exceção do grupo O que representou 20% dos isolados testados. O grupo F foi o único grupo comum aos isolados C e D. Estes resultados comprovam a existência de maior diversidade nos isolados provenientes do local medianamente contaminado (BD).

Tabela 4.2 – Grupos de plasmídeos e percentagens de isolados C, D e A presentes em cada grupo.

Grupos	Isolados	%
A	C 1-1, C 1-2	14,3
B	C 1-3, C 3-4	14,3
C	C 1-4	7,1
D	C 2-1, C 2-2, C3-2	21,4
E	C 3-1, C 5-4, C 11-1, C 11-3	28,6
F	C 8-4, C 10-3	14,3

Grupos	Isolados	%
F	D 6-4	10
G	D 1-3	10
H	D 1-4	10
I	D 2-1	10
J	D 2-2	10
K	D 2-4	10
L	D 3-2	10
M	D 6-2	10
O	D 1-2, D 3-1	20

Grupos	Isolados	%
E	A 21-3	9,1
N	A 17-3	9,1
O	A 6-1, A 8-1, A 10-3, A 14-2, A 16-2, A 18-1, A 18-2, A 18-4, A 21-4	81,8

Os isolados A foram distribuídos em 3 grupos, o grupo O compreendeu 81,8% dos isolados e representa a ausência de plasmídeos.

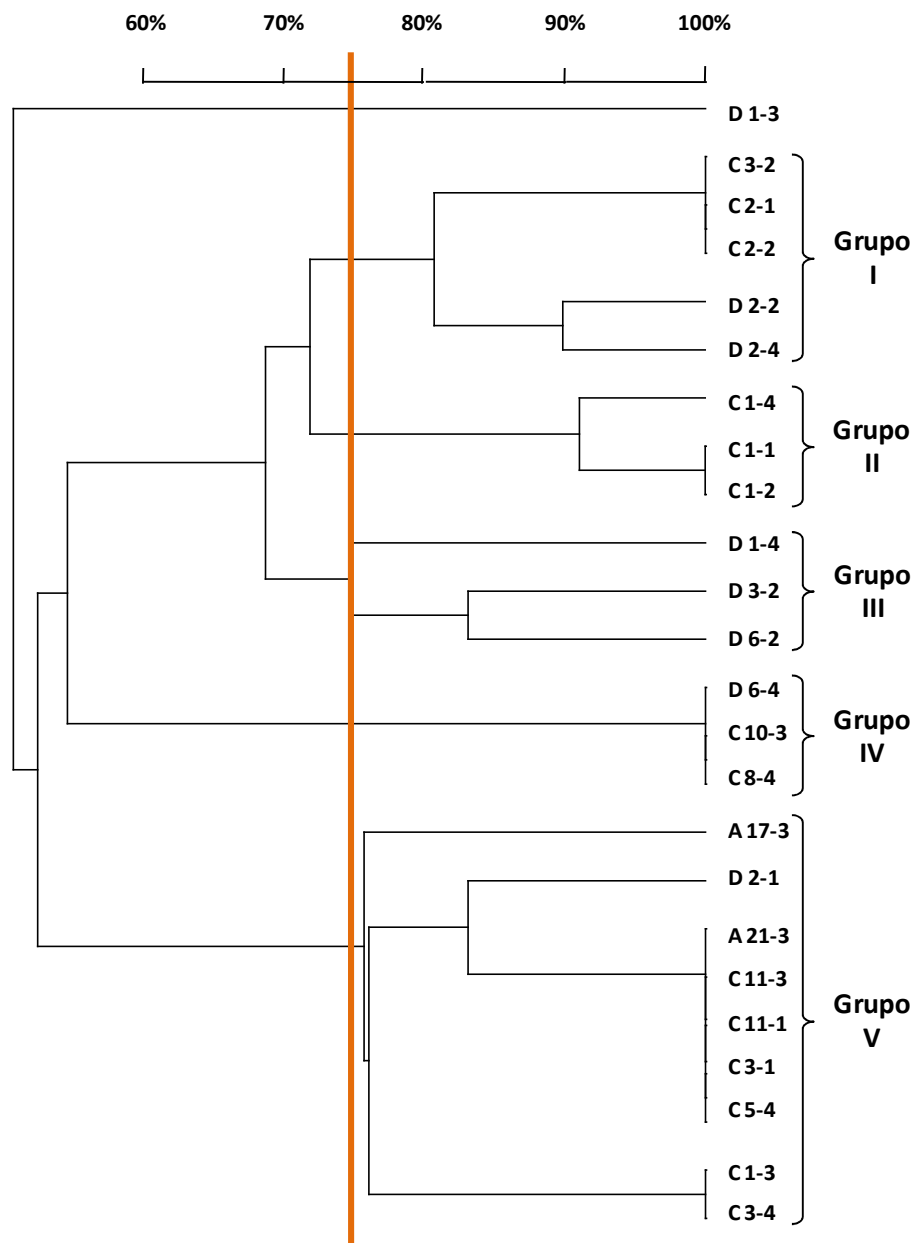


Figura 4.3 - Dendrograma obtido com os resultados dos perfis de plasmídeos de todos os isolados analisados. Estão representados os grupos obtidos a 75% de semelhança, assinalados de I a V.

O dendograma da Figura 4.3 permitiu avaliar a diversidade existente entre todos os isolados analisados, tendo em consideração a análise dos perfis de plasmídeos. Para 75% de semelhança verificou-se a distribuição dos isolados em 5 grupos mais o isolado D 1-3 que formou um ramo independente. O Grupo I é constituído na sua maioria por isolados C, alguns dos quais com 100% de semelhança entre si. Destaca-se ainda, a existência de um subgrupo que engloba os isolados D 2-2 e D 2-4 que apresentou 80% de semelhança com os restantes isolados do grupo. O Grupo II engloba isolados C com elevado grau de semelhança entre si. O Grupo III é constituído unicamente por isolados D, enquanto o Grupo IV engloba 2 isolados C com 100% de semelhança entre si e o isolado D 6-4. O Grupo V englobou vários isolados C com 100% de semelhança entre si, o isolado D 2-1, assim como os únicos isolados A onde foram encontrados plasmídeos. O isolado D 1-3 formou um ramo distinto do dendograma apresentando uma semelhança de apenas 50% com os restantes isolados.

4.3.2 REP-PCR

O DNA dos 35 isolados foi amplificado por PCR usando os *primers* REP, dando origem a fragmentos com diferentes pesos moleculares que variaram entre 8700 e 200 pb aproximadamente. Estes fragmentos foram visualizados em gel de agarose a 1%, conforme se pode observar nas Figuras 4.4, 4.5 e 4.6. Os dendogramas construídos com base nos resultados obtidos por REP-PCR também podem ser visualizados em cada uma das figuras anteriores, demonstrando uma grande diversidade genética entre as diferentes populações.

Na Figura 4.4, correspondente ao perfil de REP-PCR obtido para os isolados C e respectivo dendograma, é possível observar a existência de perfis semelhantes entre diferentes isolados. Este resultado ocorreu por exemplo para os isolados C 1-1, C 1-2 e C 1-4 que apresentaram 100% de semelhança entre si. Para uma percentagem de semelhança de aproximadamente 75% formaram-se 4 grupos distintos.

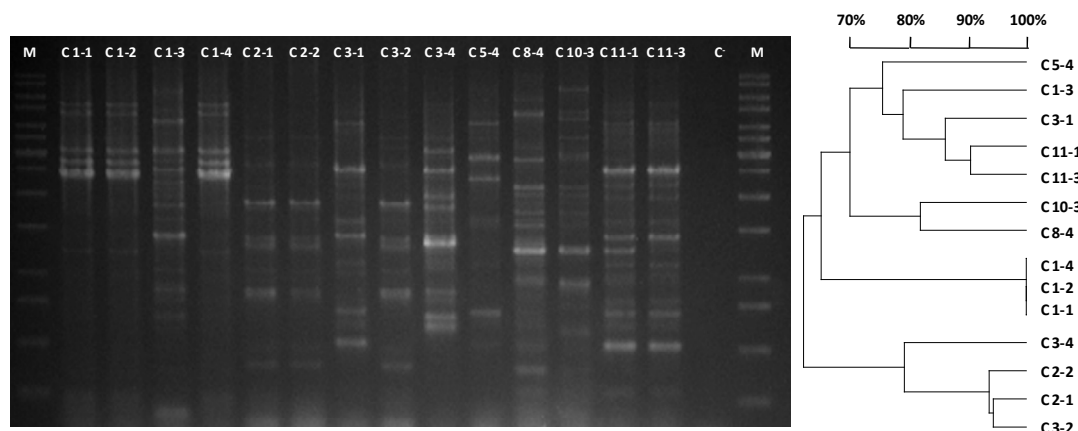


Figura 4.4 – Gel de electrophorese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referente aos isolados C. M – marcador pesos moleculares de 1 kb; C – controlo negativo (sem DNA).

O perfil de REP-PCR e o respectivo dendograma dos isolados D estão apresentados na Figura 4.5. No dendograma foi possível constatar a existência de 3 grupos, um dos quais engloba grande parte dos isolados, para uma percentagem de semelhança de 75%. Cada um dos outros dois grupos englobou 2 isolados. O máximo de semelhança obtido entre isolados foi de 99% para os isolados D 1-3 e D 1-4.

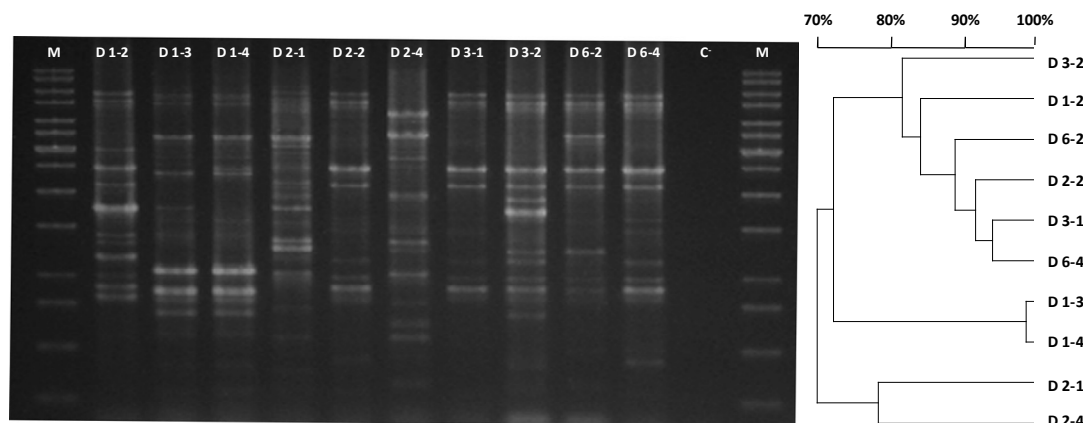


Figura 4.5 – Gel de electrophorese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referente aos isolados D. M – marcador pesos moleculares de 1 kb; C – controlo negativo (sem DNA).

Na Figura 4.6 podemos observar o perfil de REP-PCR obtido para os isolados A, assim como o respectivo dendograma. Para uma percentagem de semelhança de aproximadamente 75% os isolados ficaram reunidos em 3 grupos. Os isolados A 16-2 e A

21-3 não ficaram englobados em nenhum dos grupos referidos. O máximo de similaridade entre os isolados A foi verificado para os isolados A 14-2 e A 18-2 com 87% de semelhança.

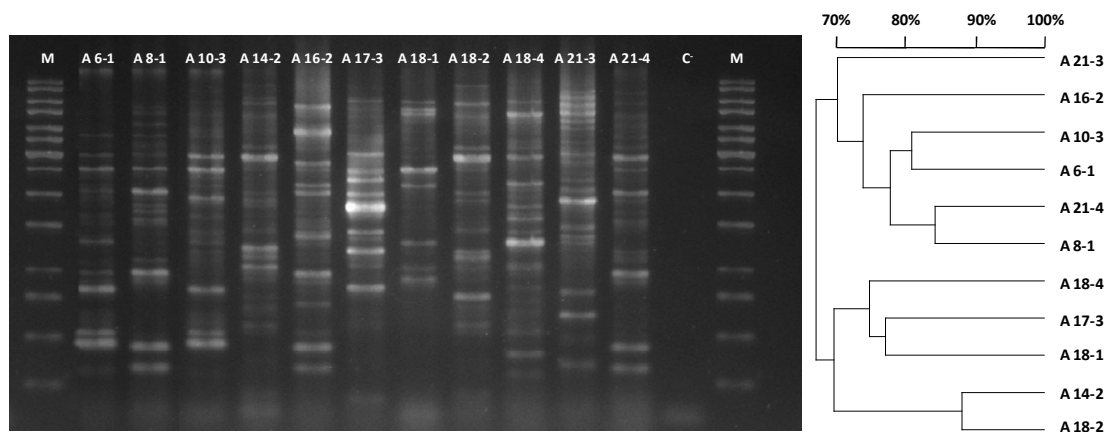


Figura 4.6 – Gel de electrophorese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por REP-PCR, referente aos isolados A. M – marcador pesos moleculares de 1 kb; C - controlo negativo (sem DNA).

4.3.3 ERIC-PCR

Os produtos resultantes da amplificação por ERIC-PCR foram visualizados em géis de agarose a 1%, conforme se pode observar nas Figuras 4.7, 4.8 e 4.9. Os produtos resultantes da amplificação variaram entre 12500 e 200 kb.

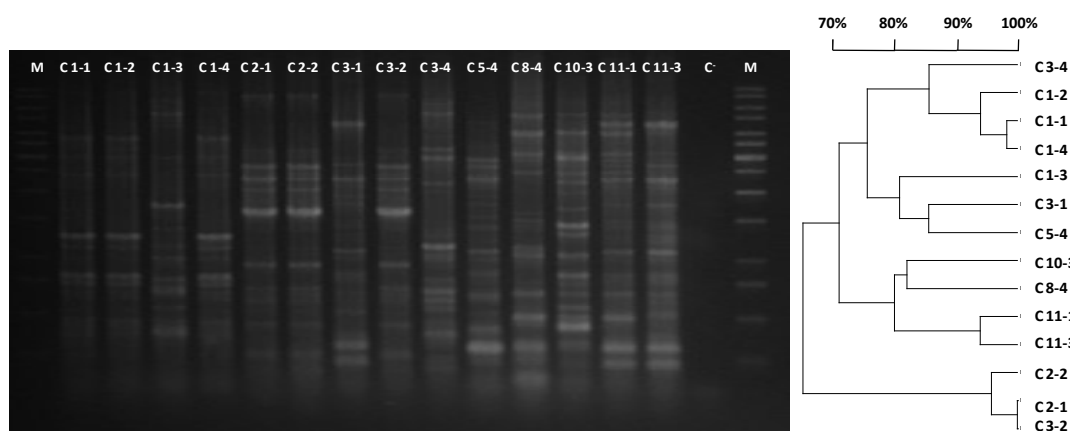


Figura 4.7 – Gel de electrophorese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente aos isolados C. M – marcador pesos moleculares de 1 kb; C - controlo negativo (sem DNA).

Na Figura 4.7 podemos observar o perfil de ERIC-PCR obtido para os isolados C e o respectivo dendograma. Para uma percentagem de semelhança de 75% formaram-se 3

grupos distintos. Os isolados C 1-1, C 1-2 e C 1-4 apresentaram uma percentagem de semelhança entre si superior a 90%, assim como os isolados C 2-1, C 2-2 e C 3-2.

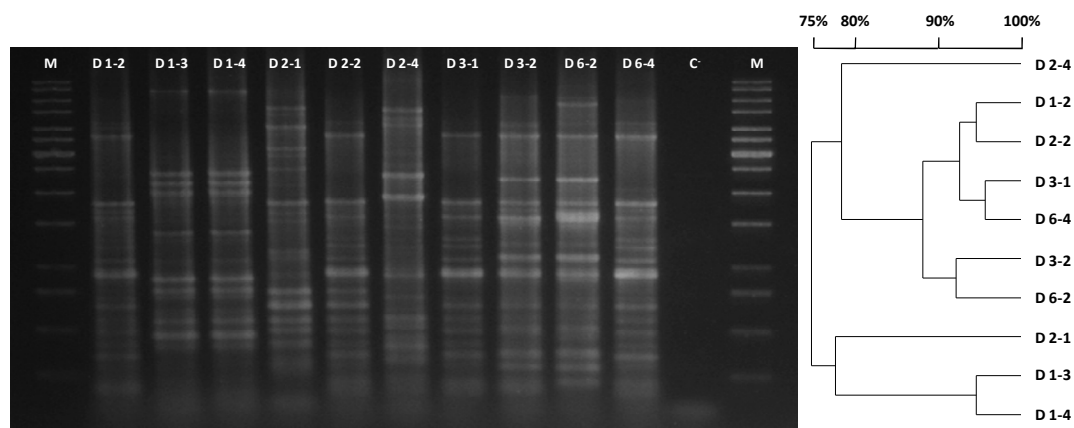


Figura 4.8 – Gel de electrophorese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente aos isolados D. M – marcador pesos moleculares de 1 kb; C - controlo negativo (sem DNA).

O perfil de ERIC-PCR dos isolados D e o respectivo dendograma estão apresentados na Figura 4.8. Pela análise do dendograma foi possível constatar a existência de um único grupo para uma percentagem de semelhança de 75%.

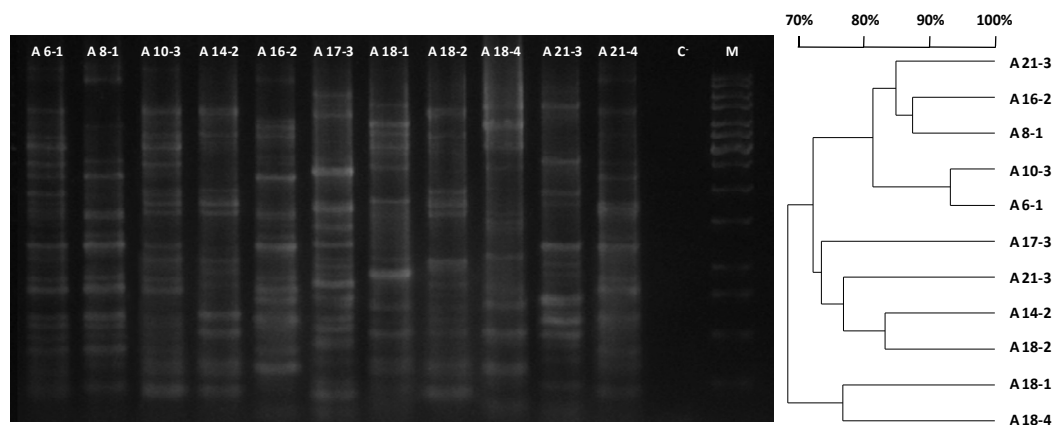


Figura 4.9 – Gel de electrophorese e respectivo dendograma, resultante da amplificação por ERIC-PCR, referente aos isolados A. M – marcador pesos moleculares de 1 kb; C - controlo negativo (sem DNA).

O perfil de ERIC-PCR e o respectivo dendograma dos isolados A estão apresentados na Figura 4.9. Para uma semelhança de 75% formaram-se 3 grupos

distintos, sendo que o primeiro grupo foi constituído por isolados com uma percentagem de semelhança entre si superior a 80%.

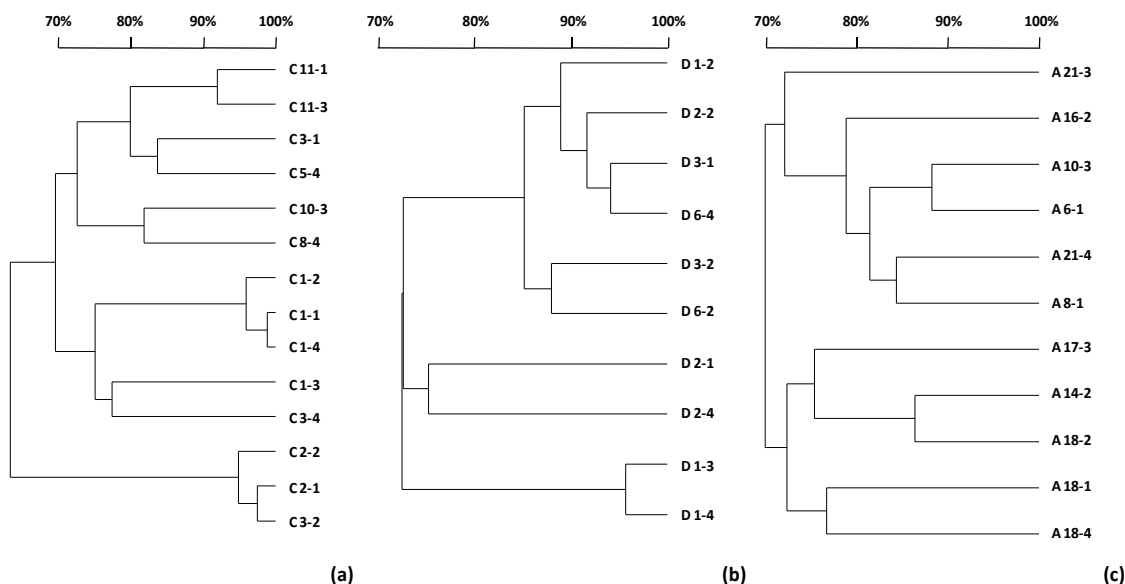


Figura 4.10 - Dendrogramas obtidos com os resultados de REP-PCR e ERIC-PCR conjugados para os isolados C (a), isolados D (b) e isolados A (c).

Da análise conjunta dos perfis de REP-PCR e ERIC-PCR resultaram os dendrogramas apresentados na Figura 4.10. Comparando estes dendrogramas com os anteriores é possível verificar que os isolados ficaram distribuídos em grupos de semelhança mais definidos, com maior fiabilidade de resultados e diminuindo a possibilidade de falsas semelhanças. Relativamente aos isolados C, o dendrograma obtido com os perfis de REP-PCR (Figura 4.4) distribuiu os isolados por 4 grupos, enquanto os perfis de ERIC-PCR apenas permitiu a separação em 3 grupos (Figura 4.7), para a mesma percentagem de semelhança (75%). Assim, a conjugação de ambos os resultados permitiu avaliar melhor a diversidade da população proveniente do local BC, agrupando os isolados em 4 grupos bem definidos para uma percentagem de semelhança de 75% (Figura 4.10a). Para os isolados D foi ainda mais importante juntar os resultados obtidos para REP-PCR e ERIC-PCR uma vez que de acordo com o dendrograma obtido com os perfis de ERIC-PCR (Figura 4.8), os isolados ficariam reunidos em apenas um grupo, contrariamente ao verificado no dendrograma obtido a partir dos perfis de REP-PCR (Figura 4.5) onde se observaram 3 grupos distintos, para a mesma percentagem de semelhança (75%). Assim, a conjugação

de ambos os resultados permitiu reunir os isolados D em 3 grupos distintos e bem definidos (Figura 4.10b). Relativamente à população do local BA, verificou-se a divisão dos isolados em 3 grupos para 75% de semelhança e o isolado A 21-3 num ramo independente, usando quer os resultados de REP-PCR ou ERIC-PCR ou conjugando ambos. Contudo, os grupos ficaram melhor definidos quando se usou a conjugação dos REP-PCR e ERIC-PCR. Pela análise dos dendogramas da Figura 4.10 foi ainda possível verificar a existência de maior diversidade entre os isolados D e principalmente entre os isolados provenientes do solo extremamente contaminado (BA), visto que o número de isolados com semelhança superior a 80% foi mais elevado entre os isolados do solo controlo do que entre os isolados dos solos contaminados.

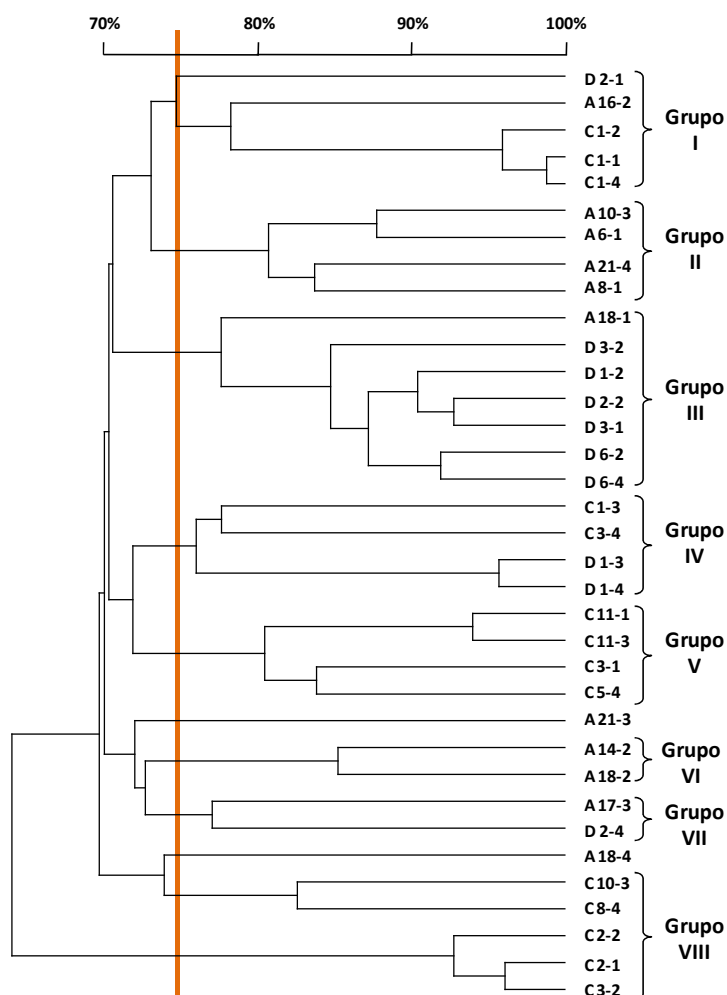


Figura 4.11 - Dendrograma obtido com os resultados do REP-PCR e ERIC-PCR conjugados, juntando os 35 isolados analisados. Estão representados os grupos obtidos a 75% de semelhança, assinalados de I a VIII.

O dendograma apresentado na Figura 4.11 engloba os isolados provenientes de todos os locais e conjuga os resultados obtidos com os perfis de REP-PCR e ERIC-PCR. Observando o dendograma foi possível reunir os isolados de todos os locais em 8 grupos diferentes para uma semelhança de 75%, sendo que os isolados A 21-3 e A 18-4 formaram ramos independentes não pertencendo a nenhum dos grupos anteriores. De um modo geral, os isolados ficaram agrupados de acordo com o seu local de origem como foi o caso dos Grupos II, III, V, VI e VIII.

4.3.4 Perfis proteínas totais

Os perfis de proteínas totais dos 35 isolados estão representados nas Figuras 4.12, 4.13 e 4.14. Os dendogramas também podem ser visualizados em cada uma das figuras anteriores, sendo possível distinguir os isolados das diferentes populações.

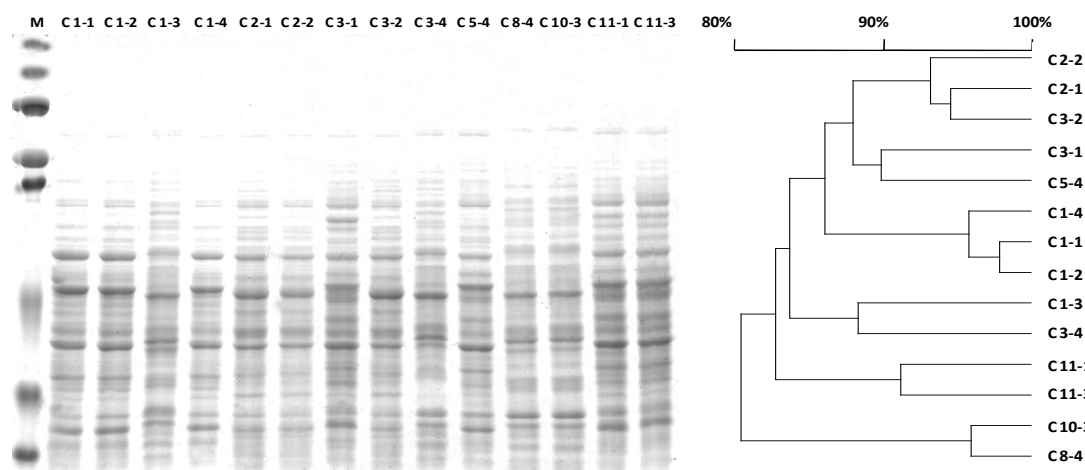


Figura 4.12 - Gel de SDS-PAGE e respectivo dendograma, obtidos a partir do conteúdo total de proteínas solúveis dos isolados C. M – marcador de gama larga (Bio-Rad).

Na Figura 4.12 podemos observar os perfis de proteínas totais de todos os isolados C, assim como o respectivo dendograma. O dendograma mostrou que todos os isolados apresentaram um grau de semelhança de 80% entre si. No entanto, para uma semelhança de 85% os isolados foram divididos em 4 grupos distintos, sendo que o primeiro grupo englobou a maioria dos isolados.

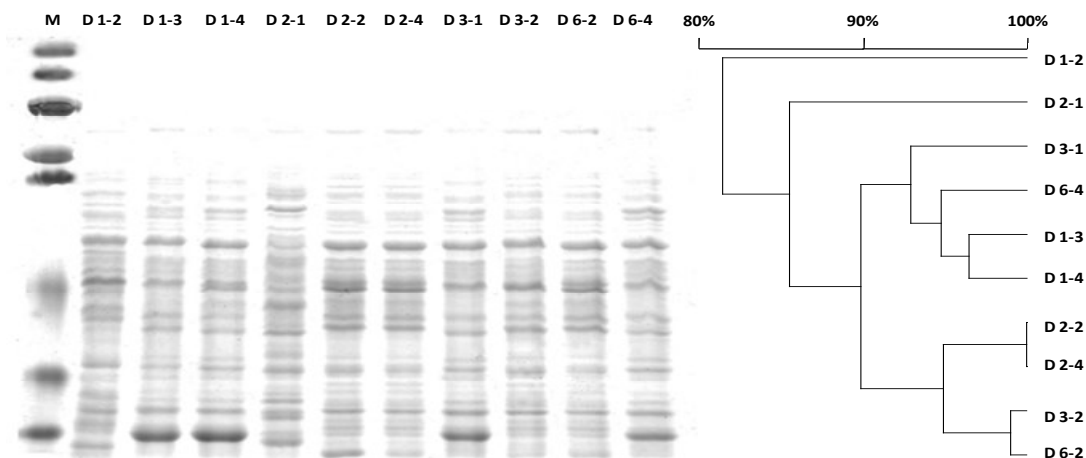


Figura 4.13 – Gel de SDS-PAGE e respectivo dendograma, obtidos a partir do conteúdo total de proteínas solúveis dos isolados D. M – marcador de gama larga (Bio-Rad).

Para uma semelhança de 85% os isolados D ficaram reunidos num único grupo que englobou a maioria das estirpes (Figura 4.13). Este grupo subdividiu-se em 2 subgrupos com um grau de semelhança superior a 90%. O isolado D 1-2 formou um grupo independente com uma semelhança 82% com os restantes isolados.

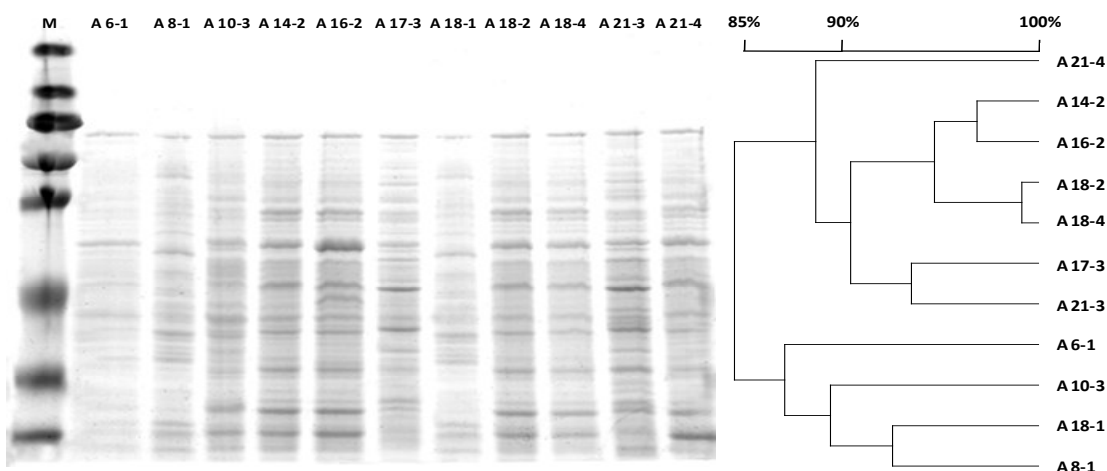


Figura 4.14 – Gel de SDS-PAGE e respectivo dendograma, obtidos a partir do conteúdo total de proteínas solúveis dos isolados A. M – marcador de gama larga (Bio-Rad).

A Figura 4.14 apresenta os perfis de proteínas dos isolados A e o respectivo dendograma. Para uma semelhança de 85% verificou-se que os isolados ficaram divididos em 2 grupos.

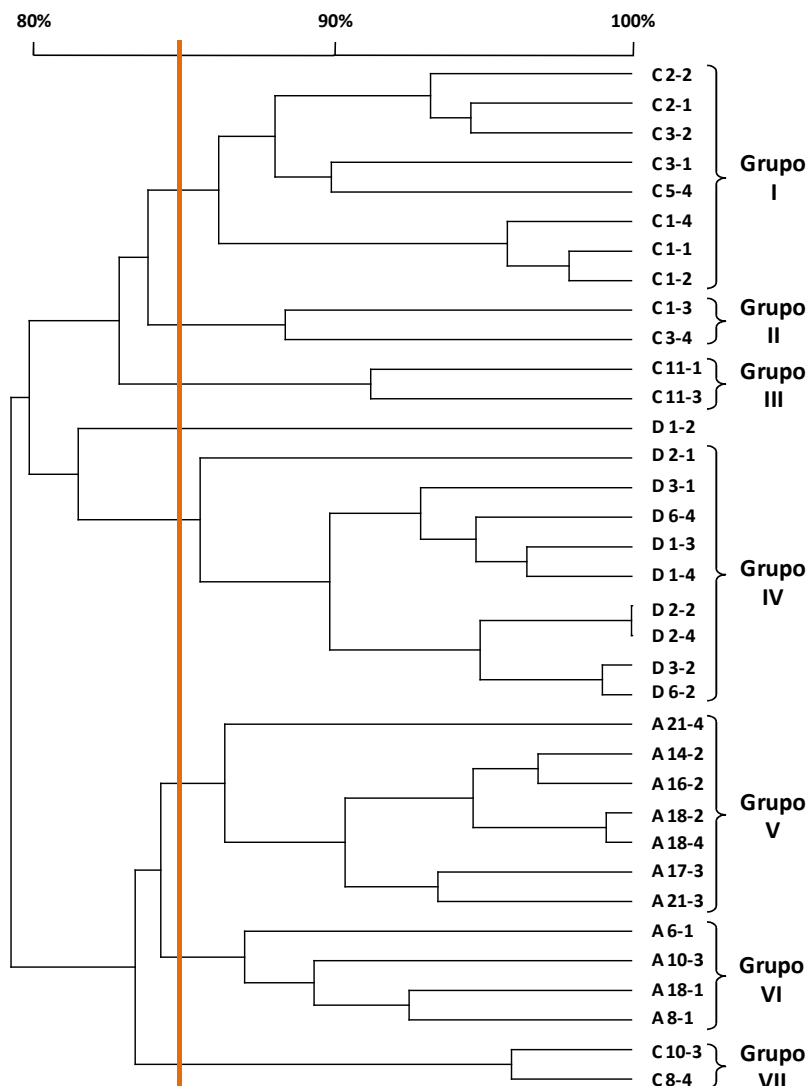


Figura 4.15 – Dendograma obtido com os resultados dos perfis de proteína total, juntando os 35 isolados analisados. Estão representados os grupos obtidos a 85% de semelhança, assinalados de I a VII.

Na Figura 4.15 é possível observar o dendograma construído a partir dos resultados obtidos dos perfis de proteínas totais de todos os isolados analisados. Para uma semelhança de 85% os isolados foram divididos em 7 grupos distintos e o isolado D 1-2 que formou um ramo independente. Todos os grupos são constituídos por isolados do mesmo local, havendo uma distinção muito clara entre as 3 populações em estudo. É ainda de realçar o Grupo VII que é constituído por isolados C que apresentaram maior

grau de semelhança com os isolados A do que com os restantes isolados C (Grupos I, II e III).

4.3.5 Perfis de lipopolissacarídeos (LPS)

Os 35 isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* foram caracterizados em relação ao seu conteúdo em lipopolissacarídeos e verificou-se uma elevada diversidade entre os perfis analisados.

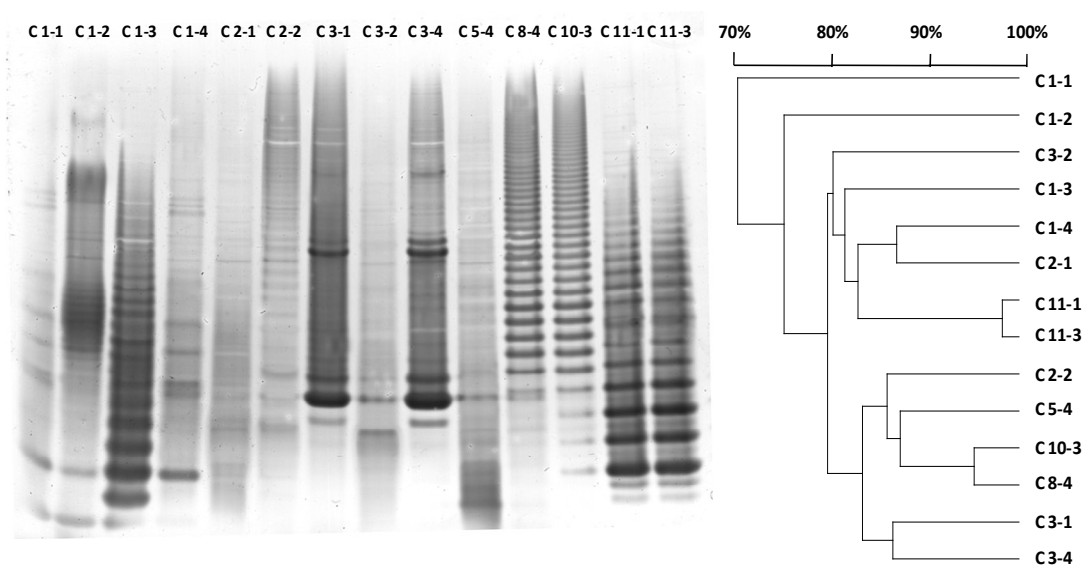


Figura 4.16 – Gel de lipopolissacarídeos e respectivo dendograma dos isolados C.

Os isolados C mostraram diferentes perfis de lipopolissacarídeos como se pode observar na Figura 4.16. Tal como é possível observar no gel e no dendograma os isolados C 11-1 e C 11-3 possuem perfis de LPS muito semelhantes entre si e bastante distintos dos restantes isolados. O mesmo sucedeu para os isolados C 8-4 e C 10-3 e C 3-1 e C 3-4. Para um grau de semelhança de 80% os isolados ficaram distribuídos em dois grandes grupos que englobaram todos os isolados com excepção dos isolados C 1-1 e C 1-2.

Os perfis dos LPS dos isolados D estão apresentados na Figura 4.17 assim como o dendograma resultante. Para um grau de semelhança igual a 80%, com excepção do isolado D 3-2, todos os isolados ficaram reunidos num único grupo, que se subdividiu em

2 subgrupos, que englobaram a maioria dos isolados. Os perfis de LPS dos isolados D 1-2 e D 3-2 foram diferentes dos restantes.

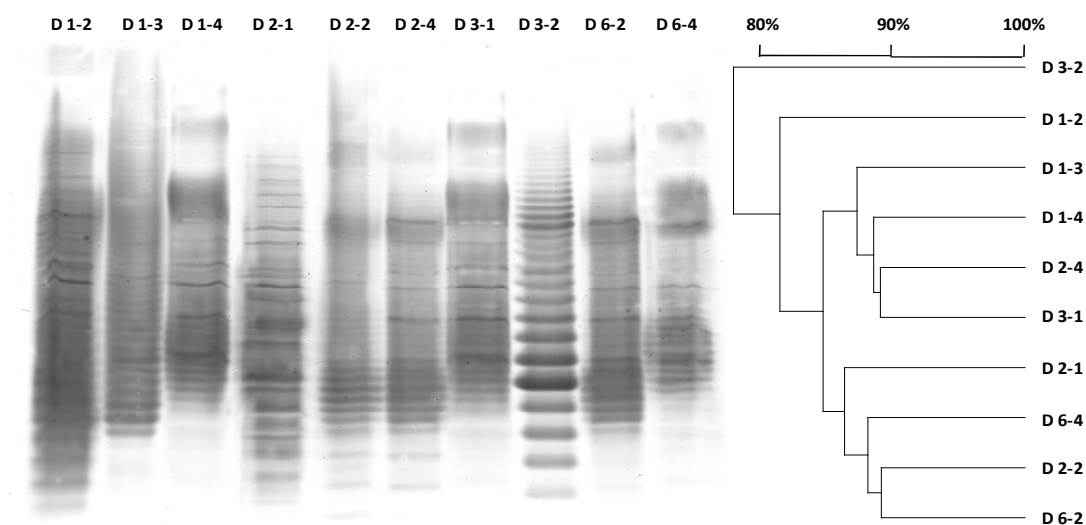


Figura 4.17 – Gel de lipopolissacarídeos e respectivo dendograma dos isolados D.

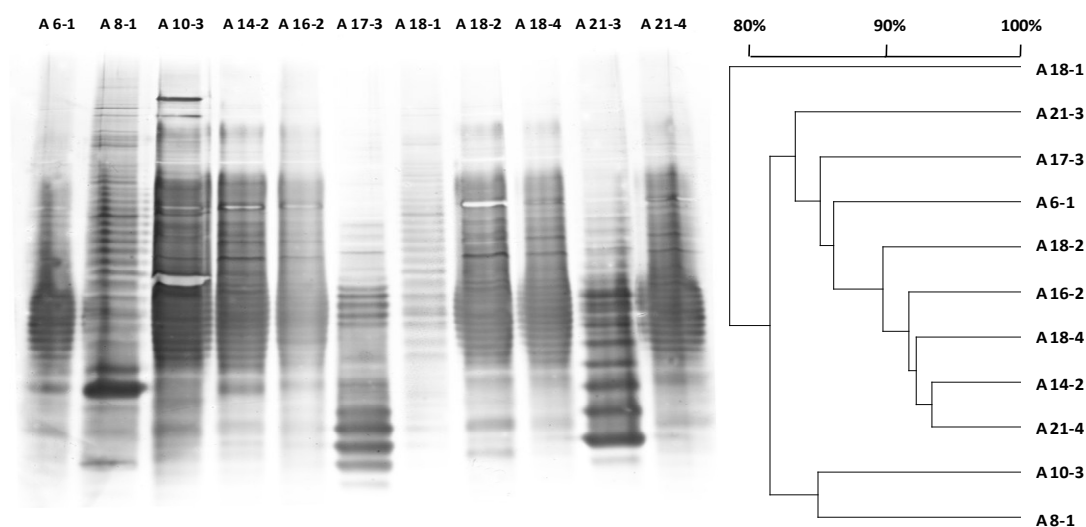


Figura 4.18 – Gel de lipopolissacarídeos e respectivo dendograma dos isolados A.

Os perfis de LPS dos isolados A foram mais semelhantes entre si do que os dos restantes isolados (Figura 4.18). Para uma semelhança de 80% verificou-se a existência de um grupo, que englobou todos os isolados com exceção do isolado A 18-1 que apresentou um perfil de LPS distinto.

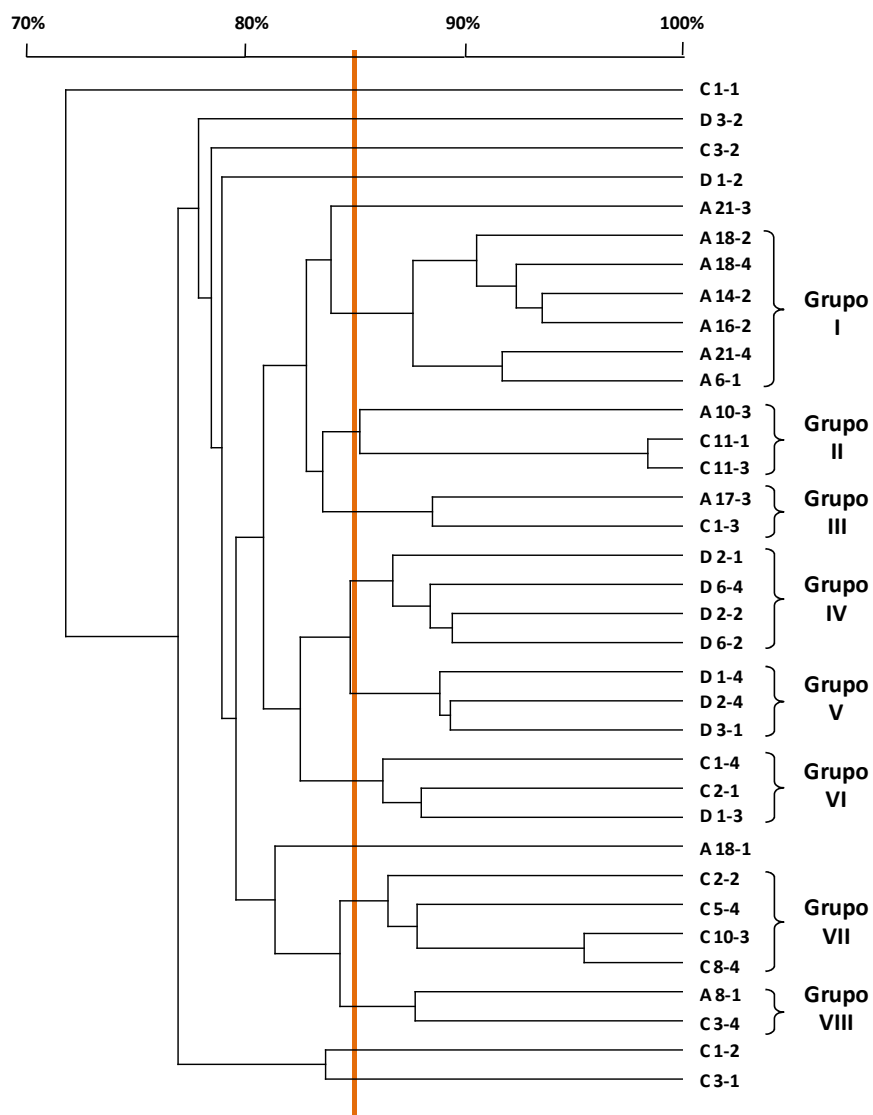


Figura 4.19 – Dendograma obtido com os resultados dos perfis de LPS, juntando os 35 isolados analisados. Estão representados os grupos obtidos a 85% de semelhança, assinalados de I a VIII.

Os 35 isolados analisados estão reunidos no dendograma da Figura 4.19 de acordo com os seus perfis de LPS. Assim, para uma semelhança de 85% os isolados ficaram distribuídos por 7 grupos. Os isolados C 1-1, C 1-2, C 3-1, C 3-2, D 1-3, D 3-2, e A 21-3 formaram ramos independentes. A maioria dos grupos são formados exclusivamente por isolados do mesmo local como é o caso dos Grupos I, IV, V e VII. Os restantes grupos englobam isolados de pelo menos 2 locais.

4.4 Discussão

A caracterização da população indígena de rizóbio tem um papel muito importante no entendimento da biodiversidade de um solo. Por outro lado, permite analisar a influência de determinados xenobióticos na estrutura das populações e perceber até que ponto as bactérias estão bem adaptadas aos stresses ambientais a que estão sujeitas.

Neste estudo, foram usadas diferentes técnicas, nomeadamente a análise do DNA-plasmídico e os perfis de REP-PCR e ERIC-PCR, para avaliar a diversidade genética das populações de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* isoladas de solos com diferentes concentrações de metais pesados. Além das técnicas para avaliar a diversidade genética os isolados pertencentes às diferentes populações (C, D e A) também foram caracterizados através dos perfis de proteínas totais e perfis de lipopolissacarídeos.

4.4.1 Perfis de plasmídeos

Os perfis de plasmídeos foram utilizados como uma componente na avaliação da diversidade dos isolados de rizóbio das diferentes populações estudadas. A análise dos perfis de plasmídeos dos isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* originou 14 grupos (Tabela 4.1) no conjunto dos 35 isolados testados, revelando uma elevada diversidade genética nas populações analisadas sobretudo nos isolados provenientes do local medianamente contaminado (BD). O número de grupos formado com base nos perfis de plasmídeos foi elevado em comparação com os resultados obtidos por Castro et al. (1997) onde 59 isolados deram origem a 10 grupos diferentes e por Lakzian et al. (2008) que obtiveram 27 grupos para 196 isolados.

No conjunto dos 35 isolados analisados identificaram-se 11 bandas com pesos moleculares entre 669 kb e 56 kb (Tabela 4.1 e Figura 4.2). Estudos anteriores mostraram que o número de plasmídeos encontrados em espécies pertencentes ao género *Rhizobium* pode variar entre 1 e 9 e o tamanho entre 50 e 950 kb (Laguerre et al., 1992; Lakzian et al., 2002; Velázquez et al., 1995; Zou et al., 1998). Analisando a Figura 4.1 é possível constatar que o plasmídeo mais frequente entre os isolados testados tem um

peso molecular aproximado de 204 kb. Alguns autores referem a possibilidade dos genes simbióticos estarem presentes em plasmídeos com pesos moleculares próximos dos 200 kb (Harrison et al., 1988; Hartman et al., 1998; Laguerre et al., 1992; Lakzian et al., 2008). Na maior parte das espécies investigadas de rizóbio, os genes que controlam a nodulação (*nod*), a especificidade do hospedeiro (*hsn*) e a fixação de azoto (*fix* e *nif*) estão contidos no plasmídeo simbiótico (pSym) (García-de-los Santos et al., 1996; Martinez et al., 1990; Somasegaran e Hoben, 1994). Assim, a deleção duma região específica de DNA de pSym ou o desaparecimento deste plasmídeo pode levar à perda parcial ou total da função simbiótica, respectivamente. De facto, embora o plasmídeo simbiótico não tenha sido identificado, a maioria dos isolados que não nodularam o trevo no teste de nodulação (Tabela 3.2 – Capítulo 3) também não possuem o plasmídeo de 204 kb, o que pode justificar a incapacidade de nodular.

Foram encontrados plasmídeos em todos os isolados provenientes do local controlo (BC) e o seu número variou entre 1 e 9. Os isolados originários dos locais contaminados apresentaram menor número de plasmídeos. Nos isolados D encontraram-se entre 0 e 3 plasmídeos e na maioria dos isolados A não se registou a presença de plasmídeos com a excepção dos isolados A 17-3 e A 21-3 que possuem 2 plasmídeos cada (Tabela 4.1 e Figura 4.2). Vários estudos têm examinado a relação entre a incidência de plasmídeos e a presença de contaminantes ambientais num determinado local. Burton et al. (1982) não encontraram diferenças significativas na incidência dos plasmídeos em solos poluídos e não poluídos. No entanto, Baya et al. (1986) verificaram maior incidência de plasmídeos entre bactérias isoladas de locais contaminados com lixo tóxico do que entre bactérias isoladas de áreas não contaminadas.

De acordo com o número e tamanho dos plasmídeos os isolados C foram divididos em 6 grupos (A-F). Os grupos D e E foram os mais frequentes representando 21,4% e 28,6% dos isolados testados, correspondendo a perfis com 4 e 2 plasmídeos, respectivamente (Tabela 4.2 e Figura 4.2). Por outro lado, os isolados D embora apresentassem menor número de plasmídeos (0-3) foram distribuídos por 9 grupos de acordo com o tamanho e localização dos plasmídeos (Tabela 4.2). O grupo F foi o único que também englobou isolados C. Os restantes grupos foram característicos deste local e

a sua dominância foi semelhante (10%), com exceção do grupo O que englobou 20% dos isolados D onde não foram encontrados plasmídeos. Estes resultados sugerem uma maior diversidade nos isolados do solo contaminado, contrariamente ao observado por outros autores. Castro et al. (1997) verificaram menor diversidade de plasmídeos na população isolada de um solo contaminado em comparação com a diversidade do solo não contaminado, o que estava relacionado com a pressão selectiva que os metais exercem nos isolados, sobrevivendo apenas os mais tolerantes e diminuindo por isso a diversidade. Hirsch et al. (1993) também verificaram uma diversidade reduzida entre os isolados de rizóbio de solos contaminados tendo encontrado o mesmo perfil de plasmídeos em todos os isolados. A diversidade da população A não pôde ser avaliada com recurso à análise dos perfis de plasmídeos, uma vez que a maioria dos isolados não possui plasmídeos.

Juntando todos os isolados onde foi possível encontrar plasmídeos num único dendograma (Figura 4.3), constatou-se a formação de 5 grupos distintos para uma semelhança de 75%. O isolado D 1-3 foi o único que não foi englobado nestes grupos tendo formado um ramo distinto neste dendograma com semelhança inferior a 60%. Estes resultados sugerem que embora a população D apresente maior diversidade plasmídica, as duas populações estão bem relacionadas entre si. Adicionalmente, foi possível verificar que a maioria dos grupos englobou isolados C e D com uma percentagem de semelhança superior a 80% (Figura 4.3), tendo-se verificado o mesmo para os dois isolados A onde foram encontrados plasmídeos.

4.4.2 Análise dos perfis de REP-PCR e ERIC-PCR

A amplificação do DNA dos isolados com os *primers* REP e ERIC deu origem a fragmentos com diferentes pesos moleculares que variaram entre 8700 e 200 pb e 12500 e 200 pb, respectivamente. Todos os isolados mostraram perfis complexos e com elevado número de bandas (Figuras 4.4 a 4.9). Os dendogramas construídos com base nos perfis de REP e ERIC-PCR individualmente mostraram diferenças no número de grupos formados assim como nas relações entre alguns isolados. De um modo geral, os perfis de REP-PCR foram mais discriminatórios ou seja separaram os isolados num maior número de grupos quer na população do solo BC quer na do solo BD. Estes resultados sugerem que os

primers ERIC possuem menor capacidade para diferenciar os isolados destas populações. Sikora e Redžepović (2003) obtiveram resultados similares mostrando que os perfis de REP-PCR permitiram distinguir ligeiramente melhor as estirpes dentro de cada grupo. Relativamente aos isolados A não se registaram diferenças em termos de número de grupos formados quando se utilizaram os perfis de REP e de ERIC-PCR separadamente. No entanto, verificou-se que os perfis de REP-PCR permitiram distinguir melhor entre estirpes próximas. Foi o caso dos isolados A 16-2 e A 21-3 que no dendograma construído com base nos perfis de REP-PCR se encontravam em ramos distintos dos restantes grupos e com apenas 70% de semelhança, enquanto no dendograma resultante do ERIC-PCR estes isolados ficaram num grupo que engloba 5 estirpes com as quais apresentaram uma semelhança superior a 80%. Vários autores consideram importante usar os resultados dos REP-PCR e ERIC-PCR em conjunto de modo a aumentar a fiabilidade dos resultados e diminuir a possibilidade de falsas semelhanças (Elboutahiri et al., 2009; Judd et al., 1993; Saldaña et al., 2003).

Da análise conjunta dos perfis de REP e ERIC-PCR resultaram os dendogramas apresentados na Figura 4.10. Estes resultados permitiram avaliar melhor a diversidade da população proveniente do local BC, agrupando os isolados em 4 grupos bem definidos para 75% de semelhança (Figura 4.10a) sendo que a maioria dos isolados (80%) apresentou uma semelhança entre si superior a 80%. A diversidade verificada entre os isolados C foi inferior à observada para as populações dos solos contaminados, em especial entre os isolados A. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Delorme et al. (2003) e Ibekwe et al. (1997), que verificaram maior diversidade genética nas populações de rizóbio provenientes de solos contaminados. Contudo, a maioria dos estudos realizados em solos contaminados revelam uma reduzida diversidade nas populações bacterianas devido à pressão selectiva exercida pelos metais (Bååth, 1992; Castro et al., 1997; Díaz-Raviña e Bååth, 1996; Hirsch et al., 1993). No caso particular dos solos da mina do Braçal a contaminação foi lenta e progressiva em resultado da actividade mineira que decorreu durante mais de 100 anos. Contrariamente aos locais onde as contaminações são rápidas e agudas, resultando na selecção de um reduzido número organismos tolerantes (Giller et al., 1998), a contaminação lenta e progressiva

pode favorecer a adaptação/aclimatização de mais rizóbios à elevada toxicidade dos metais promovendo a diversidade rizobiana nos solos contaminados. Este aumento de diversidade poderá também estar relacionado com a transferência horizontal de plasmídeos entre bactérias. Por outro lado, os plasmídeos também providenciam variação genética actuando como fonte de recombinação.

Os perfis de plasmídeos e os perfis de REP e ERIC-PCR permitiram diferenciar os isolados de rizóbio, assim como avaliar a diversidade das diferentes populações. Contudo, a análise dos perfis de REP e ERIC-PCR mostrou-se mais eficiente na distinção entre isolados do que a análise dos plasmídeos. Por exemplo, os isolados C 11-1, C 11-3, C 1-3 e C 5-4 apresentaram o mesmo perfil de plasmídeos o que os colocou no mesmo grupo (grupo E). No entanto, quando analisamos os perfis de REP e ERIC-PCR constatou-se que a semelhança é de apenas 80%. Por outro lado, também se observaram isolados com perfis plasmídicos distintos (ex. D 1-3 e D 1-4; D 3-1 e D 6-4) mas que segundo os perfis de REP e ERIC-PCR estão muito relacionados. Estes resultados não são completamente inesperados, uma vez que os isolados podem perder ou sofrer deleções parciais de um plasmídeo (Weaver et al., 1990), podem ocorrer recombinações ou rearranjos entre os plasmídeos (Zhang et al., 2001) ou troca de plasmídeos entre bactérias (Louvrier et al., 1996). Segundo Laguerre et al. (1993) os isolados com uma composição genética igual ao nível do cromossoma possuem geralmente perfis plasmídicos diferentes. No entanto, vários autores também demonstraram que algumas estirpes de *R. leguminosarum* bv. *viciae* com perfis plasmídicos idênticos tendem a ser muito próximos a nível do cromossoma (Handley et al., 1998; Laguerre et al., 1996). É importante salientar que perfis idênticos de plasmídeos não significam similaridade na constituição genética dos mesmos. A semelhança observada neste trabalho foi baseada apenas no número e tamanho dos plasmídeos. Para avaliar a similaridade genética dos plasmídeos em si, seriam necessárias técnicas de RFLP-PCR baseadas nos genes *nod* e plasmídeos simbióticos (Laguerre et al., 1996). Assim, o uso dos resultados da análise dos perfis plasmídicos para avaliar a diversidade nas populações de rizóbio pode ter um valor limitado e deverá constituir apenas uma componente na avaliação e servir de complemento a outras técnicas.

4.4.3 Perfis proteicos e perfis de lipopolissacarídeos

Vários autores têm utilizado os perfis de proteínas totais para caracterizar estirpes de rizóbio (Alexandre et al., 2006; Laranjo et al., 2004; Moreira et al., 1993; Strufii et al., 1998).

Neste trabalho foram obtidos diferentes perfis de proteínas e estes variaram entre as populações de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* analisadas, tendo permitido diferenciar os isolados de cada população. Os perfis proteicos também evidenciaram maior diversidade nas populações dos solos contaminados BD e BA do que no solo controle (BC). No entanto, o grau de semelhança entre os isolados foi superior a 80% em todas as populações (Figuras 4.12, 4.13 e 4.14). Este resultado sugere que o poder de discriminação desta técnica é inferior ao poder de discriminação dos métodos genéticos, ao contrário do sugerido por Nick et al. (1999). Resultados similares foram obtidos por Alexandre et al. (2006) que verificaram que os perfis de DAPD têm maior poder de discriminação que os perfis proteicos em estirpes de *Mesorhizobium*. No entanto, é importante referir que os isolados foram agrupados de forma muito semelhante quando se usaram os perfis de REP e ERIC-PCR ou os perfis de proteínas. Por exemplo, os isolados C 1-1, C 1-2 e C 1-3 mostraram elevado grau de semelhança entre si qualquer que tenha sido a técnica usada, o mesmo se verificou para os isolados C 11-1 e C 11-3, C 8-4 e C 10-3, D 2-1 e D 2-4, entre outros. Estes resultados comprovam que a análise dos perfis proteicos constitui uma técnica fiável para distinguir estirpes próximas.

O dendograma da Figura 4.15 agrupa todos os isolados testados tendo como base os seus perfis proteicos. Foi possível constatar que os perfis de proteínas foram muito característicos de cada local uma vez que no dendograma os grupos englobam exclusivamente isolados pertencentes à mesma população. Contrariamente à análise de REP e ERIC-PCR (Figura 4.11) onde alguns grupos partilham isolados pertencentes a solos diferentes.

A análise dos perfis de lipopolissacarídeos também é uma técnica muito utilizada para caracterizar e distinguir estirpes de rizóbio (Carareto e Lemos, 1996; de Maag et al., 1988). Os LPS fazem parte de uma família de macromoléculas complexas que são

componentes membranares integrantes do envelope celular de todas as bactérias Gram-negativas (Helander et al., 2001; Sutherland, 1985). Embora os lipopolissacarídeos dos diversos grupos de bactérias possam ter uma composição bastante diferente, todos eles têm a mesma estrutura principal. Nas moléculas de LPS podem distinguir-se 3 partes: o lípido A, o núcleo e o antígeno O, que é constituído por repetições de unidades de oligossacarídeos (Varillas et al., 2006).

Neste estudo observou-se diferenças entre os perfis de LPS dos isolados das 3 populações (Figura 4.16, 4.17 e 4.18). Para uma semelhança igual a 80% foi possível distribuir os isolados C em 2 grupos, sendo que os isolados C 1-1 e C 1-2 formaram ramos distintos do dendograma com menor semelhança. Na população do local C destacam-se os isolados C 8-4 e C 10-3 e os isolados C 11-1 e C 11-3 que possuem um perfil idêntico entre si mas muito diferente dos restantes isolados. Este perfil é chamado de perfil em escada e as diferentes bandas correspondem ao antígeno O (Varillas et al., 2006). Os isolados dos solos contaminados (BD e BA) evidenciaram menor diversidade de perfis de LPS do que os solos BC (Figura 4.16). Para 80% de semelhança quer os isolados D, quer os isolados A ficaram reunidos num único grupo (Figura 4.17 e 4.18). O dendograma da Figura 4.20 reúne os 35 isolados com base nos seus perfis de LPS. Este dendograma mostrou a existência de uma forte relação entre o local de origem e os perfis de isolados, tal como sucedeu com os perfis de proteínas.

Neste estudo os perfis LPS foram reprodutíveis e geraram diferentes bandas que permitiram distinguir os isolados. No entanto, estes resultados agruparam as estirpes de forma um pouco diferente. Por exemplo, os isolados C 8-4 e C 10-3 e os isolados C 11-1 e C 11-3 continuam a estar muito relacionados entre si e a pertencer ao mesmo grupo, mas outros isolados como o C 1-1, C 1-2 e C 1-4 apresentaram perfis bastante distintos, o que os coloca em grupos menos relacionados. Tendo-se verificado o mesmo para alguns dos isolados D e A. Por outro lado, os isolados do solo controlo revelaram maior diversidade de perfis de LPS do que os isolados dos solos contaminados. Estes resultados não eram esperados uma vez que a heterogeneidade dos LPS é uma característica importante para aumentar a sobrevivência em condições ambientais menos favoráveis (Sharma et al., 2005; Tao et al., 1992).

4.4.4 Diversidade entre isolados do mesmo nódulo

Tal como foi explicado no Capítulo 3 desta tese algumas das estirpes foram isoladas do mesmo nódulo, uma vez que de acordo com Somasegaran e Hoben (1994) cada nódulo pode conter diferentes estirpes. De facto, a análise dos plasmídeos, dos perfis de REP e ERIC-PCR e dos perfis de proteínas e LPS revelaram a existência de diferenças entre isolados do mesmo nódulo. No caso dos isolados C 1-1, C 1-2, C 1-3 e C 1-4 essa diferença foi notória. Enquanto os isolados C 1-1, C 1-2 e C 1-4 apresentaram uma semelhança superior a 90%, tendo como critério de análise os perfis de plasmídeos, os REP e ERIC-PCR assim como dos perfis de proteínas, o isolado C 1-3 apresentou características muito diferentes o que o colocou em grupos distantes e mais relacionado com estirpes isoladas de nódulos diferentes. Do ponto de vista da nodulação e fixação de azoto também se observaram diferenças entre estas estirpes, uma vez que o isolado C 1-3 foi o único que não nodulou o trevo no teste de nodulação. Os isolados C 1-2 e C 1-4 também estão bem relacionadas em termos de capacidade simbiótica visto que apresentaram taxas de ESR de 57 e 21%, respectivamente. As estirpes D 1-2, D 1-3 e D 1-4 também foram isolados do mesmo nódulo. No entanto, tendo em consideração os perfis de REP e ERIC-PCR e os perfis de proteínas, o grau de semelhança entre os isolados D 1-3 e D 1-4 foi superior a 90% contrariamente ao verificado para isolado D 1-2. Este isolado foi capaz de nodular o trevo branco no teste de nodulação contrariamente aos outros dois isolados. O isolado D 2-2 também mostrou grandes diferenças em relação aos isolados D 2-1 e D 2-4, quer ao nível da diversidade quer ao nível da capacidade simbiótica visto ter uma ESR de 35%, enquanto os isolados D 2-1 e D 2-4 apenas nodularam o trevo sem conseguirem fixar azoto. Estes resultados confirmam a existência num mesmo nódulo de várias estirpes com diferentes capacidades simbióticas.

Capítulo 5

Tolerância dos isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* aos metais pesados e ao arsénio

5.1 Introdução

Os metais pesados resultantes das actividades agrícolas e industriais afectam os sistemas biológicos. As primeiras observações dos efeitos dos metais nos processos microbianos do solo datam do início do século XX. No entanto, só mais tarde entre 1960 e 1970, é que se percebeu o verdadeiro efeito dos metais nos microrganismos do solo e nos processos adjacentes. A contaminação extrema com metais pesados em resultado das emissões em grande escala de fundições provocou efeitos adversos claramente visíveis, que se caracterizaram pela acumulação de camadas espessas de matéria orgânica na superfície do solo, devido à inibição da actividade dos microrganismos e da fauna (Freedman e Hutchinson, 1980).

A contaminação com metais pesados é generalizada e por esse motivo os microrganismos enfrentam os efeitos adversos destes elementos em diferentes tipos de habitats (Haferburg e Kothe, 2007). As bactérias são geralmente os microrganismos mais abundantes nos solos (Lynch, 1988). Devido ao seu tamanho reduzido, as bactérias possuem uma grande superfície em relação ao seu volume, o que resulta numa elevada área de contacto com o ambiente circundante. Além de existirem em grande número e possuírem uma elevada área de contacto com o meio ambiente, estes organismos tem

um envelope celular carregado negativamente que os coloca em vantagem para acumular os catiões metálicos do meio ambiente (Collins e Stotzky, 1992).

Os metais pesados podem influenciar as populações bacterianas de diferentes formas. Vários autores estudaram o efeito dos metais ao nível do crescimento, actividades bioquímicas, biomassa e diversidade (Bååth et al., 1998; Roane e Pepper, 2000; Sandaa et al., 1999; Sandaa et al., 2001). Os efeitos directos dos metais caracterizam-se pela disrupção das membranas biológicas, alteração da especificidade e actividade de enzimas, substituição de metais essenciais dos seus locais nativos de ligação e alterações na estrutura conformacional de ácidos nucleicos e proteínas (Bruins et al., 2000).

A maioria dos trabalhos onde é avaliada a toxicidade dos metais pesados para os microrganismos do solo foi realizada através do seu isolamento e posterior análise em laboratório (Doelman et al., 1994; Huysman et al., 1994). No entanto, alguns autores consideram esta análise redutora uma vez que não permite avaliar a tolerância das bactérias ao nível da comunidade. Assim, na década de 90 as técnicas de incorporação de timidina e leucina, originalmente usadas para estimar as taxas de crescimento das células bacterianas, foram adaptadas para estudar a tolerância a metais pesados das comunidades bacterianas do solo (Bååth, 1992; Díaz-Raviña e Bååth, 1996; Díaz-Raviña et al., 1994). Estes autores verificaram que além dos efeitos tóxicos directos, os metais podem exercer uma pressão selectiva na comunidade microbiana, resultando na presença de microrganismos mais tolerantes nas áreas poluídas quando comparados com os presentes nos solos não contaminados. De facto, vários autores referem que as bactérias isoladas de solos contaminados são mais tolerantes aos metais do que as isoladas de solos não contaminados (Angle et al., 1993a; Chaudri et al., 1992a).

O isolamento de organismos tolerantes de locais contaminados com metais é muito comum. Alguns autores conseguiram isolar bactérias de locais inóspitos como foi o caso de Stoppel e colaboradores (1995) que isolaram de um tanque de óleo mineral uma estirpe de *Klebsiella oxytoca* tolerante a 10 mM níquel. Mergeay et al. (1985) também isolaram uma estirpe de *Ralstonia metallidurans* extremamente tolerante ao zinco, cádmio e cobalto de um tanque de decantação numa fábrica de zincagem.

Adicionalmente, vários trabalhos evidenciam o isolamento de bactérias fixadoras de azoto tolerantes a vários metais, de solos contaminados com lamas residuais (Angle et al., 1993b; Chaudri et al., 1992a), com efluentes industriais (Castro, 1999; Pereira et al., 2006a) ou de solos de minas (Carrasco et al., 2005; Pereira et al., 2006a).

A tolerância dos isolados pode estar relacionada com a presença de plasmídeos específicos. De facto, os genes que conferem adaptações específicas aos xenobióticos incluindo os metais pesados, estão muitas vezes localizados nos plasmídeos (Cervantes e Gutierrez-Corona, 1994, Silver, 1992). A correlação entre a pressão selectiva exercida pelos contaminantes e a existência do mesmo plasmídeo sugere que estes elementos têm um papel primordial na adaptação das bactérias aos metais pesados (Silver, 1992; Silver e Misra, 1988). O *Rhizobium* geralmente contém plasmídeos de elevado peso molecular que englobam 25% do seu DNA (Beringer e Hirsch, 1984). Além do plasmídeo simbiótico que transporta a informação necessária para a nodulação e fixação de azoto, as bactérias de rizóbio possuem outros plasmídeos designados de crípticos que podem conferir vantagens na adaptação aos stresses ambientais (Hynes e McGregor, 1990).

Neste contexto, os objectivos deste capítulo foram:

- Avaliar a tolerância dos isolados em meio artificial a diferentes metais pesados (Pb, Cd, Ni, Cu, Co) e ao metalóide arsénio;
- Relacionar a tolerância dos isolados com a contaminação de metais observada no seu local de origem.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Material Biológico

Os 35 isolados provenientes dos diferentes locais da mina do Braçal (14 isolados do solo BC; 10 isolados do solo BD e 10 isolados do solo BA) foram analisados do ponto de vista da sua tolerância aos diferentes metais pesados (Cu, Ni, Co, Cd e Pb) e ao metalóide As, a maioria dos quais estão presentes em quantidades elevadas nos solos BD e BA.

5.2.2. Soluções de metais pesados e de arsénio utilizadas

Para fazer as soluções “stock” de cada um dos metais pesados testados, assim como do metalóide As utilizaram-se os seguintes compostos: $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NiCl_2 , CoCl_2 , CdCl_2 , PbNO_3 e NaAsO_2 . As soluções foram preparadas em água desionizada e esterilizadas por filtração usando filtros descartáveis Millipore de 0,2 μm de diâmetro de poro.

5.2.2 Determinação dos níveis de tolerância dos isolados a metais pesados e ao metalóide As

As tolerâncias dos diferentes isolados foram determinadas em meio ML líquido suplementado com diferentes concentrações de metais pesados e de As. No caso do Pb adicionou-se 1 mM de EDTA ao meio de crescimento de forma ao metal não precipitar (Carrasco et al., 2005). Os isolados foram incubados a 28 °C, com agitação (150 rpm) durante 72 h. A densidade óptica (600 nm) dos isolados foi determinada após a inoculação e no final das 72 h. As concentrações testadas dos diferentes metais foram as seguintes: Cu - 0,125, 0,25, 0,5 e 1 mM; Ni - 0,125, 0,25, 0,5, 1 e 2 mM; Co - 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 e 2,5 mM; Cd – 0,020, 0,035, 0,065, 0,125, 0,25, 0,5 e 1 mM; Pb – 0,25, 0,5, 1, 2, 3, e 4 mM; As – 0,25, 0,5, 1, 2, 4 e 6 mM. Foram determinadas as percentagens de inibição do crescimento em relação ao controlo (sem metal) para cada concentração e metal pesado testado.

5.3 Resultados

5.3.1 Cobre

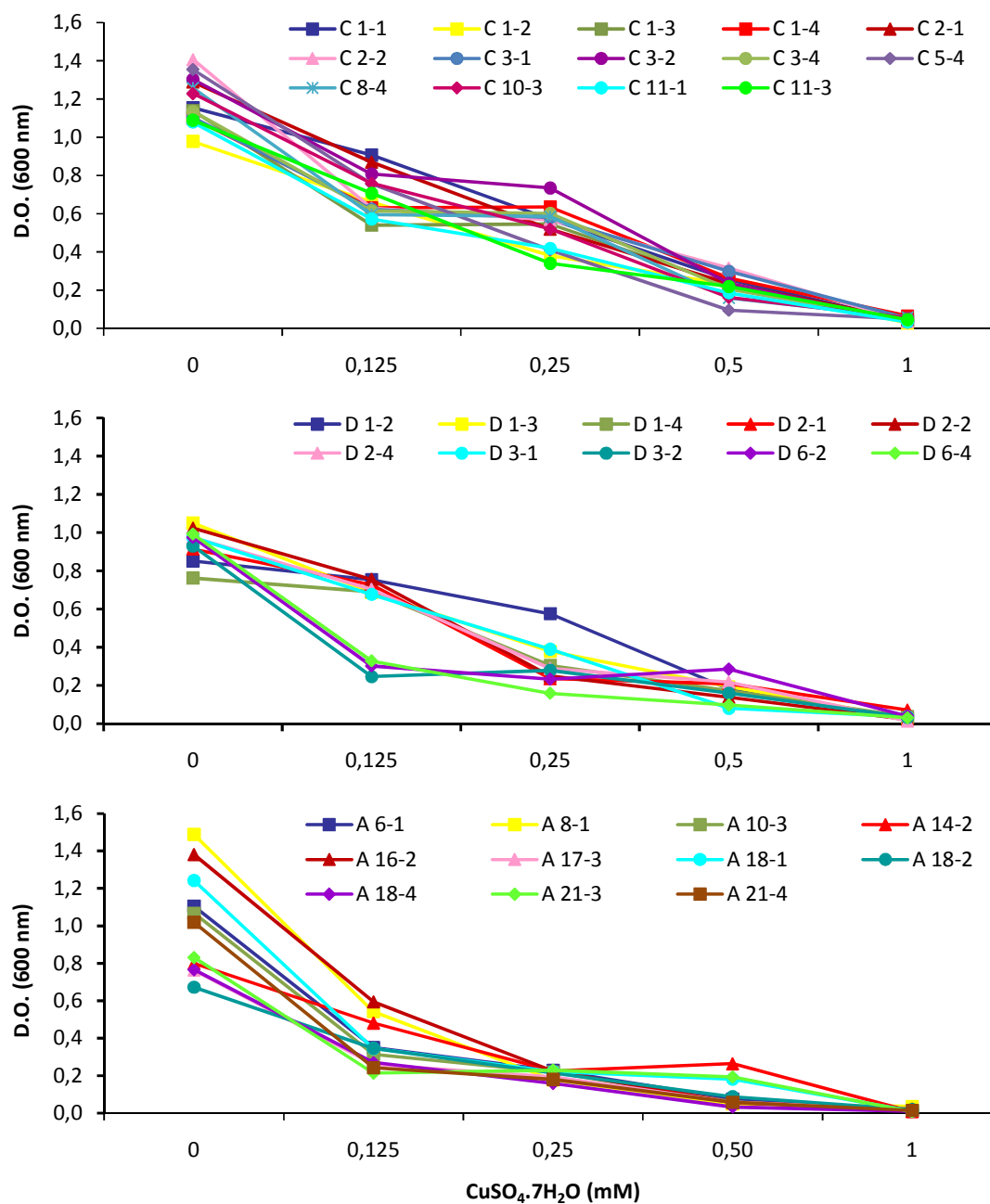


Figura 5.1 – Crescimento dos isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* dos diferentes locais (BC, BD e BA) em meio ML suplementado com diferentes concentrações de cobre (0,125, 0,25, 0,5 e 1 mM). Os resultados são médias de 12 a 18 réplicas.

A tolerância ao Cu dos isolados provenientes dos diferentes locais de amostragem está apresentada na Figura 5.1. Embora a concentração máxima tolerada (1 mM) tenha sido igual para todos os isolados, as percentagens de inibição do crescimento em cada concentração diferiram (Tabela 5.1). De um modo geral, os isolados C foram mais sensíveis ao cobre do que os isolados D (Tabela 5.1). Estes isolados foram divididos em 2 grupos de acordo com a sua tolerância a este metal (Tabela 5.1). O grupo D1 inclui os isolados D 1-2, D 1-3, D 1-4, D 2-1, D 2-2, D 2-4 e D 3-1 que foram mais tolerantes, uma vez que as inibições do crescimento foram próximas dos 20 e 60% nas concentrações de 0,125 e 0,25 mM, respectivamente. O grupo D2 inclui os isolados mais sensíveis (D 3-2, D 6-2 e D 6-4) a este metal, que apresentaram inibições do crescimento superiores a 70% nas concentrações referidas anteriormente. Os isolados A evidenciaram grande sensibilidade ao Cu, já que para a concentração mais baixa testada (0,125 mM) a inibição do crescimento foi superior a 60% e nas concentrações seguintes também se verificaram inibições muito elevadas (> 78%) (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Média das percentagens de inibição de crescimento dos isolados de cada local para as concentrações de Cu testadas. **D1** - isolados D 1-2, D 1-3, D 1-4, D 2-1, D 2-2, D 2-4 e D 3-1; **D2**- isolados D 3-2, D 6-2 e D 6-4.

Média das taxas de inibição do crescimento				
Isolados	Cobre (mM)			
	0,125	0,25	0,50	1
C	41	55	81	96
D1	23	62	81	96
D2	70	76	81	96
A	64	78	89	98

5.3.2 Níquel

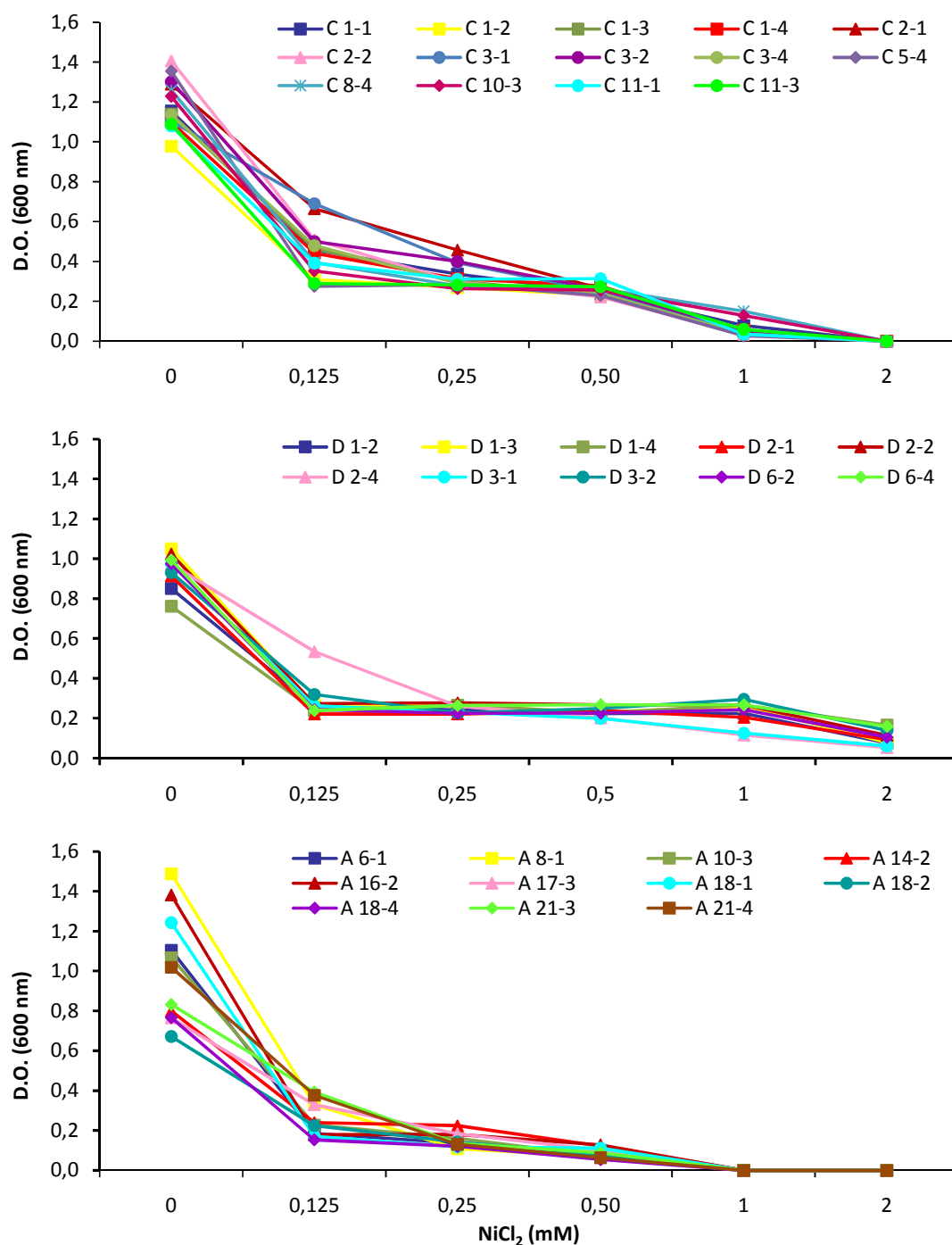


Figura 5.2 - Crescimento dos isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* dos diferentes locais (BC, BD e BA) em meio ML suplementado com diferentes concentrações de níquel (0,125, 0,25, 0,5, 1 e 2 mM). Os resultados são médias de 12 a 20 réplicas.

Na Figura 5.2 podemos observar a tolerância dos diferentes isolados ao níquel. A concentração máxima tolerada variou entre as populações estudadas. Os isolados C conseguiram sobreviver até à concentração de 1 mM de Ni, embora com inibições do crescimento superiores a 95%. Os isolados D embora tenham evidenciado uma elevada percentagem de inibição do crescimento (70%) na concentração de 0,125 mM de Ni, esta percentagem manteve-se ao longo das restantes concentrações e estes isolados apresentaram crescimento até à concentração de 2 mM de Ni (Tabela 5.2 e Figura 5.2). Os isolados A mostraram grande sensibilidade ao níquel não conseguindo tolerar concentrações superiores a 0,5 mM.

Tabela 5.2 – Média das percentagens de inibição de crescimento dos isolados de cada local para as concentrações de Ni e Co testadas.

Isolados	Média das taxas de inibição do crescimento									
	Níquel (mM)					Cobalto (mM)				
	0,125	0,25	0,50	1	2	0,125	0,25	0,50	1	2
C	62	73	78	95	100	63	71	74	95	93
D	70	73	75	75	89	43	66	70	72	87
A	73	84	90	100	100	63	85	91	100	100

5.3.3 Cobalto

Na Figura 5.3 podemos observar o efeito das diferentes concentrações de Co no crescimento dos diferentes isolados. A maioria dos isolados C apresentou crescimento até à concentração de 1 mM de Co, embora com inibições do crescimento muito elevadas (> 95%). Sendo de salientar os isolados C 8-4 e C 10-3 que mostraram um comportamento diferente conseguindo tolerar até 2,5 mM de Co. No entanto, a tolerância média dos isolados C foi inferior à registada para os isolados D (Tabela 5.2). De facto, todos os isolados D conseguiram crescer à concentração de 2 mM e com inibições do crescimento muito inferiores às analisadas para os isolados C a 1 mM. Os isolados A apenas evidenciaram crescimento até à concentração de 0,5 mM e a média das percentagens de

inibição do crescimento foi muito elevada em todas as concentrações testadas (Tabela 5.2).

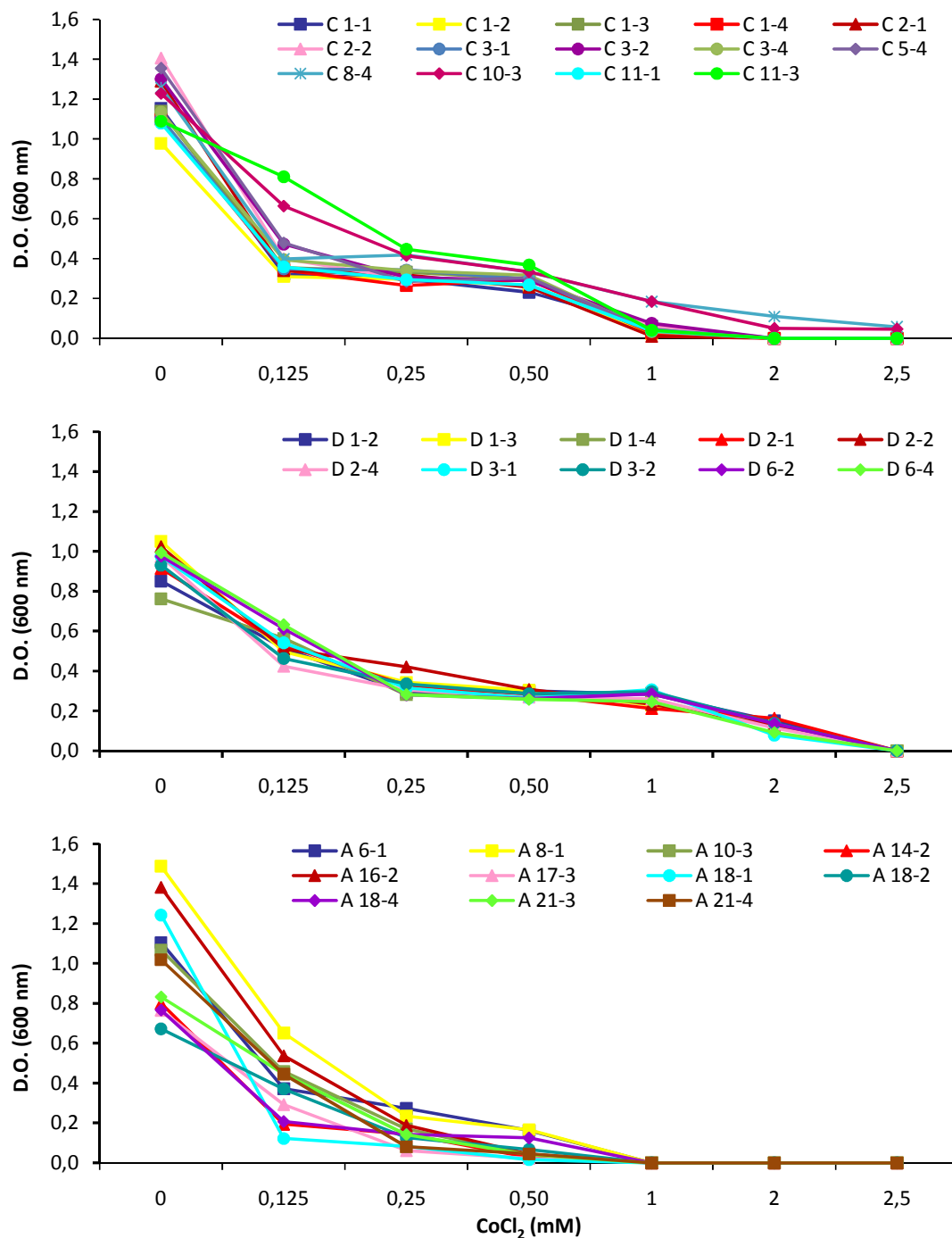


Figura 5.3 – Crescimento dos isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* dos diferentes locais (BC, BD e BA) em meio ML suplementado com diferentes concentrações de cobalto (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 e 2,5 mM). Os resultados são médias de 12 a 15 réplicas.

5.3.4 Cádmio

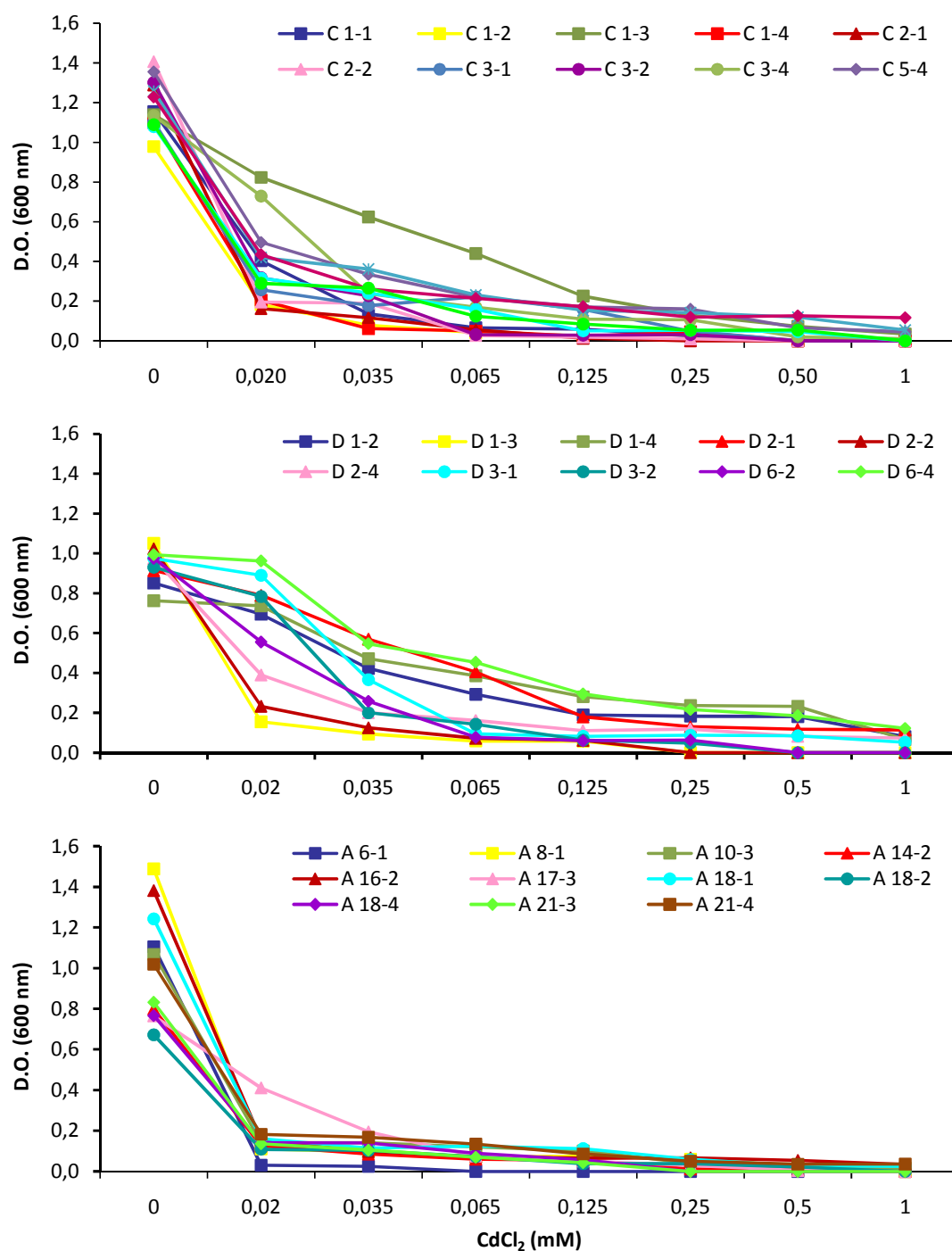


Figura 5.4- Crescimento dos isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* dos diferentes locais (BC, BD e BA) em meio ML suplementado com diferentes concentrações de cádmio (0,020, 0,065, 0,125, 0,25, 0,5 e 1 mM). Os resultados são médias de 10 a 16 réplicas.

O efeito das diferentes concentrações de cádmio no crescimento dos isolados de rizóbio está apresentado na Figura 5.4. Os isolados C foram muito sensíveis ao cádmio tendo apresentado inibições do crescimento muito elevadas (>80%) a partir da concentração de 0,035 mM. No entanto, os isolados C 1-3 e C 3-4 mostraram maior tolerância a este metal. Os isolados A também evidenciaram grande sensibilidade ao cádmio, uma vez que o seu crescimento foi muito reduzido em todas as concentrações (Tabela 5.3). Por outro lado, os isolados D mostraram diferentes tolerâncias ao cádmio tendo sido a população mais tolerante a este metal (Tabela 5.3). Estes isolados foram divididos em dois grupos de acordo com a tolerância demonstrada: o grupo D1, constituído pelos isolados mais tolerantes (D 1-2, D 1-4, D 2-1, D 3-1, D 3-2, D 6-4) com inibições do crescimento muito reduzidas nas primeiras concentrações e o grupo D2 que engloba os isolados mais sensíveis, com inibições de crescimento muito elevadas em todas as concentrações testadas (D 1-3, D 2-2, D 2-4, D 6-2).

Tabela 5.3 – Média das percentagens de inibição de crescimento dos isolados de cada local para as concentrações de Cd testadas. **D1** – isolados D 1-2, D 1-4, D 2-1, D 3-1, D 3-2 e D 6-4 ; **D2** – isolados D 1-3, D 2-2, D 2-4 e D 6-2.

Isolados	Média das taxas de inibição do crescimento						
	Cádmio (mM)						
	0,020	0,035	0,065	0,125	0,25	0,50	1
C	68	80	87	92	94	97	99
D1	11	52	67	79	83	85	92
D2	66	82	91	93	95	97	98
A	83	88	91	93	96	98	98

5.3.5 Chumbo

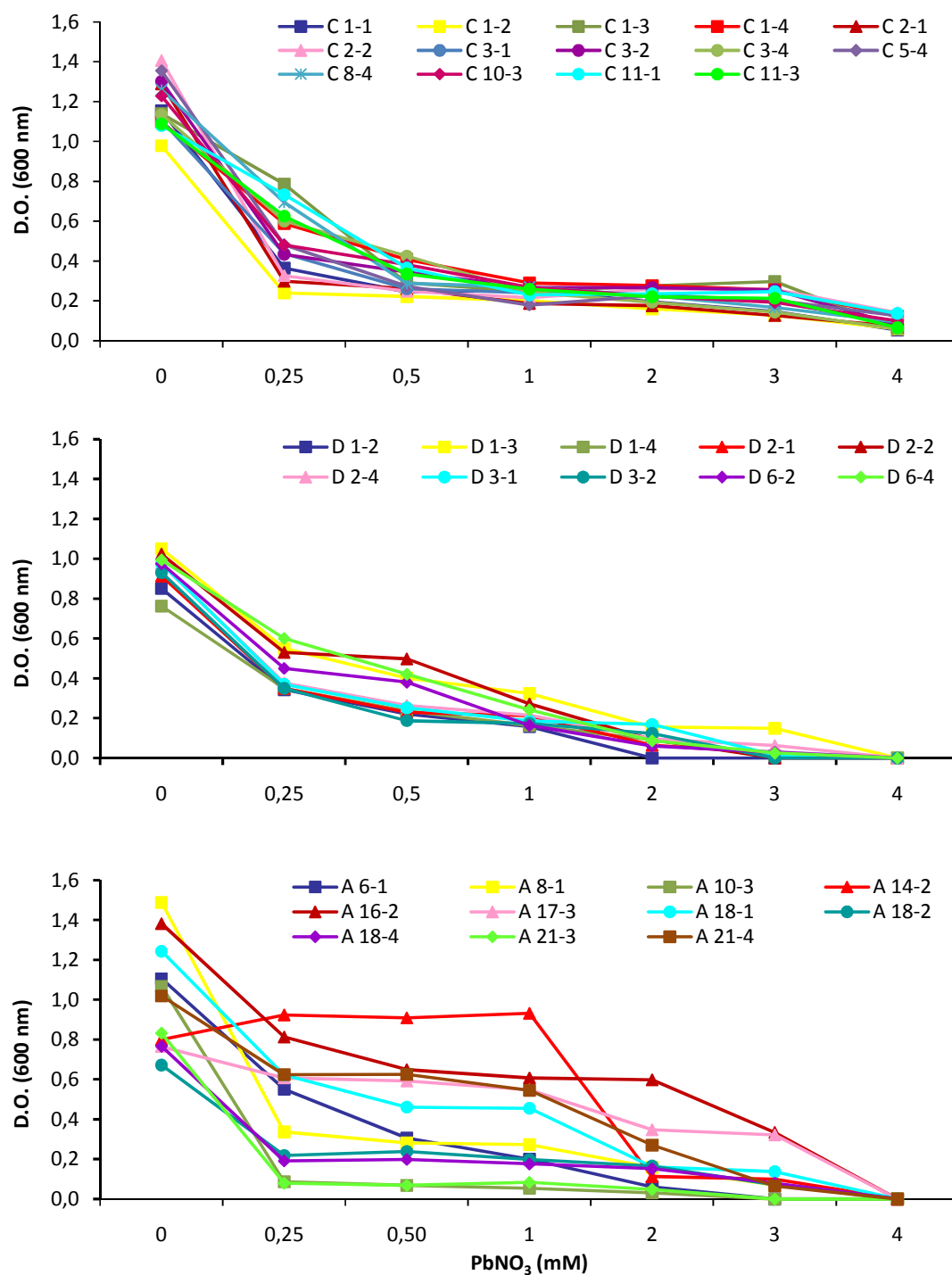


Figura 5.5 – Crescimento dos isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* dos diferentes locais (BC, BD e BA) em meio ML suplementado com diferentes concentrações de chumbo (0,25, 0,5, 1, 2, 3 e 4 mM). Os resultados são médias de 12 a 18 réplicas.

Na Figura 5.5 podemos observar o efeito das diferentes concentrações de Pb no crescimento dos isolados de rizóbio. Os isolados C toleraram até 4 mM de Pb, embora com inibições do crescimento superiores a 90% (Tabela 5.4), ao contrário do observado para os isolados D e A que apenas toleraram até 3 mM deste metal. A diversidade de tolerâncias entre os isolados C foi reduzida uma vez que todos os isolados demonstraram a mesma tendência, ou seja uma inibição do crescimento superior a 50% na concentração de 0,25 mM e inibições superiores a 70% nas concentrações seguintes. Destacam-se no entanto, os isolados C 1-3, C 1-4, C 8-4, C 11-1 e C 11-3 onde a inibição do crescimento foi menos acentuada, principalmente na concentração de 0,25 mM. A tolerância dos isolados D ao chumbo foi superior à verificada para os isolados C (Tabela 5.4). Os isolados D foram divididos em dois grupos com tolerâncias diferentes a este metal: o grupo D1 engloba os isolados D1-3, D 2-2, D 6-2 e D 6-4 com maior tolerância ao Pb e o grupo D2 (D 1-2, D 1-4, D 2-1, D 2-4, D 3-1 e D 3-2) que reúne os isolados mais sensíveis a este metal. A população do solo BA foi a mais tolerante ao chumbo ao contrário do verificado para os restantes metais. Nestes isolados a diversidade de tolerância ao Pb possibilitou a divisão dos isolados em dois grupos. O grupo A1 é constituído pelos isolados A 14-2, A 16-2, A 17-3, A 18-1 e A 21-4 que mostraram inibições do crescimento de apenas 27% na concentração de 0,25 mM, mantendo a elevada tolerância até à concentração de 1 mM de Pb. Há ainda a salientar que dois destes isolados, respectivamente A 16-2 e A 17-3, se destacaram dos restantes, mostrando para a concentração de 3 mM uma taxa de inibição relativamente baixa (75 e 58%, respectivamente). Os isolados A 6-1, A 8-1, A 10-3, A 18-2, A 18-4 e A 21-3 constituem o grupo A2 e evidenciaram uma menor tolerância ao chumbo exibindo percentagens de inibição muito elevadas (>75%) em todas as concentrações testadas (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Média das percentagens de inibição de crescimento dos isolados de cada local para as concentrações de Pb testadas. **D1** – isolados D1-3, D 2-2, D 6-2 e D 6-4; **D2** - isolados D 1-2, D 1-4, D 2-1, D 2-4, D 3-1 e D 3-2; **A1** – isolados A 14-2, A 16-2, A 17-3, A 18-1 e A 21-4; **A2** - isolados A 6-1, A 8-1, A 10-3, A 18-2, A 18-4 e A 21-3.

Média das taxas de inibição do crescimento						
Isolados	Chumbo (mM)					
	0,25	0,50	1	2	3	4
C	57	74	79	81	83	93
D1	47	57	75	88	95	100
D2	60	74	79	90	97	100
A1	27	32	35	46	81	100
A2	75	80	83	87	96	100

5.3.6 Arsénio

A tolerância dos isolados ao arsénio está apresentada na Figura 5.6. Todos os isolados C mostraram crescimento na concentração de 6 mM, tendo-se verificado o mesmo para os isolados D. Relativamente aos isolados A, apenas 37% conseguiram crescer a 6 mM de As. As populações C e D tem tolerâncias semelhantes a este metal, enquanto os isolados A apresentaram maior sensibilidade ao arsénio (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 – Média das percentagens de inibição de crescimento dos isolados de cada local para as concentrações de As testadas.

Média das taxas de inibição do crescimento						
Isolados	Arsénio (mM)					
	0,25	0,50	1	2	4	6
C	66	75	79	82	86	92
D	65	75	75	80	82	86
A	79	84	87	89	89	90

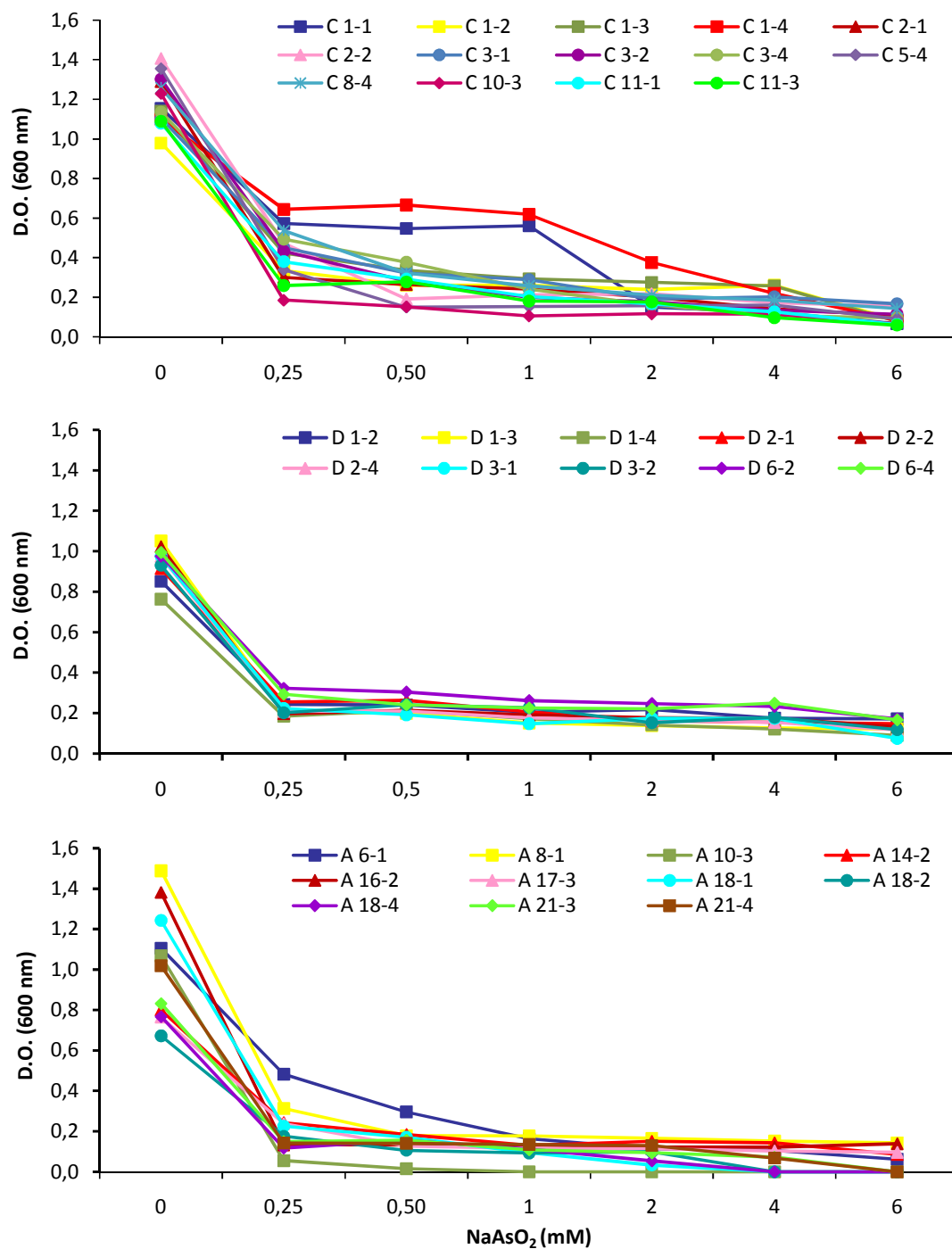


Figura 5.6 – Crescimento dos isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* dos diferentes locais (BC, BD e BA) em meio ML suplementado com diferentes concentrações de arsênio (0,25, 0,5, 1, 2, 4 e 6 mM). Os resultados são médias de 10 a 16 réplicas.

5.4 Discussão

Neste estudo, foi testada a capacidade de todos os isolados de rizóbio para crescerem em meio suplementado com diferentes concentrações de metais pesados (Cu, Ni, Co, Cd, Pb) e do metalóide As.

De acordo com Gadd (1992), o Cu, Ni e Co são considerados metais essenciais para o crescimento das células, embora possam tornar-se tóxicos quando as concentrações ótimas são ultrapassadas. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que estes três metais provocaram toxicidade nos isolados de rizóbio, a concentrações iguais ou superiores a 0,125 mM. De facto, na concentração mais baixa testada (0,125 mM) as percentagens de inibição do crescimento para a maioria dos isolados foram elevadas (Tabelas 5.1 e 5.2). Os níveis de tolerâncias a estes três metais variaram entre os isolados das populações estudadas. De um modo geral, os isolados C foram menos tolerantes ao Cu, Ni e Co do que os isolados provenientes do solo medianamente contaminado (BD). Por outro lado, os isolados A mostraram grande sensibilidade a estes metais, uma vez que para todas as concentrações testadas as percentagens de inibição do crescimento foram muito elevadas (Tabelas 5.1 e 5.2).

O Cd, Pb e As são elementos não essenciais visto não exercerem quaisquer funções fisiológicas conhecidas no organismo, sendo tóxicos para a célula mesmo em baixas concentrações (Gadd, 1992). De um modo geral, o cádmio foi o metal que provocou maior toxicidade no rizóbio, visto que a gama de concentrações toleradas pela maioria dos isolados foi muito baixa (0,020 a 1 mM) em comparação com a gama de concentrações toleradas para o chumbo (0,25 a 4 mM) e para o arsénio (0,25 a 6 mM). De facto, de acordo com vários autores o cádmio é um dos metais pesados que maior toxicidade exerce em rizóbio (Chaudri et al., 1992a; Matsuda et al., 2002).

De um modo geral, a população do solo BD foi mais tolerante aos metais pesados testados, com excepção do chumbo onde os isolados A evidenciaram maior tolerância. Geralmente, as bactérias isoladas de solos contaminados são mais tolerantes aos metais do que as bactérias isoladas de solos não contaminados (Angle et al., 1993a; Chaudri et al., 1992a). Os resultados obtidos neste trabalho confirmam em parte o descrito anteriormente por outros autores, uma vez que os isolados D foram mais tolerantes,

provavelmente por estarem mais adaptados às concentrações elevadas de metais no solo de origem (BD). No entanto, os isolados A são provenientes de um local ainda mais contaminado do que o local BD, e a sua tolerância aos metais e ao As foi menor, com excepção do chumbo. Este resultado não foi totalmente inesperado uma vez que a maioria dos isolados A não possui plasmídeos. De acordo com Silver e Misra (1988) os plasmídeos transportam genes que conferem tolerância a xenobióticos, incluindo aos metais pesados. Além dos genes de resistência a metais, os plasmídeos também transportam genes que podem ser de extrema importância na adaptação das estirpes a condições de stresse. De acordo com Baldani et al. (1992) e Hynes e McGregor (1990) os genes envolvidos na biosíntese de LPS estão localizados nos plasmídeos crípticos das estirpes de *R. leguminosarum* bv. *viciae* e bv. *trifolii*, tendo-se verificado o mesmo para os exopolissacarídeos. Os LPS e exopolissacarídeos podem ser de extrema importância na sequestração dos metais no exterior da célula diminuindo a sua entrada e consequente toxicidade (Beveridge e Murray, 1980; Pereira et al., 2006b).

Alguns autores também estudaram a relação entre a incidência de plasmídeos nos microrganismos e a presença de contaminantes num dado local, tendo verificado que o número de plasmídeos era superior nos microrganismos isolados de solos contaminados quando em comparação com os dos solos não contaminados (Anisimova et al., 1993; Baya et al., 1986; Campbell et al., 1995; Hada e Sizemore, 1981; Lakzian et al., 2002, 2007; Rasmussen e Sorensen, 1998; Sobczyk et al., 1997). Os resultados obtidos neste estudo contrariam o descrito anteriormente, uma vez que os isolados C possuem um número de plasmídeos muito superior ao verificado nos isolados D e A (Figura 4.2 – Capítulo 4), embora em termos de diversidade plasmídica esta seja superior nos isolados D (Tabela 4.2). Assim, o facto dos isolados provenientes solo BD possuírem menor número de plasmídeos não influenciou a sua tolerância aos diferentes metais pesados e ao As.

Os isolados A foram muito tolerantes ao chumbo e a diversidade de tolerâncias foi elevada (Figura 5.5 e Tabela 5.4). O chumbo foi o único metal para o qual a população A mostrou estar bem adaptada. Este resultado sugere que as concentrações de Pb extremamente elevadas e muito acima dos limites impostos por lei presentes no solo BA (Tabela 2.4 – Capítulo 2), exerceram uma grande pressão nos isolados de rizóbio, o que os

levou a desenvolver mecanismos de tolerância a este metal de forma a conseguirem sobreviver. Os mecanismos de tolerância a metais geralmente estão associados a sistemas de efluxo codificados por genes de resistência que habitualmente se localizam nos plasmídeos. De acordo com Borremans et al. (2001) a tolerância da bactéria *Ralstonia metallidurans* CH34 ao chumbo está relacionada com a existência do operão *pbr* que combina funções envolvidas na absorção, efluxo e acumulação de Pb, localizado no plasmídeo pMOL30 desta estirpe. No entanto, uma vez que a maioria dos isolados A não possui plasmídeos, a sua tolerância ao Pb poderá estar associada a genes de resistência presentes no cromossoma ou a outro tipo de mecanismos não relacionados com sistemas de efluxo. Vários autores conseguiram isolar bactérias resistentes ao chumbo de locais muito contaminados com metais pesados (Borremans et al., 2001; Pereira et al., 2006a; Roane, 1999). De acordo com Aiking et al. (1985) a bactéria *Klebsiella aerogenes* tolera concentrações elevadas de chumbo através da sua precipitação no citoplasma. Resultados similares foram obtidos por Roane (1999) com estirpes de *Bacillus megaterium*. Também Levinson e Mahler (1998) mostraram que as estirpes tolerantes ao chumbo de *Staphylococcus aureus* e *Citrobacter freundii* acumulavam o metal intracelularmente sob a forma de complexos Pb-fosfato.

A maioria dos estudos realizados até ao momento relaciona a maior tolerância dos isolados provenientes de locais contaminados com uma diminuição da diversidade. Esta diminuição está relacionada com a pressão selectiva exercida pelos metais nas comunidades bacterianas, o que leva à eliminação dos genótipos menos resistentes ficando apenas aqueles que conseguem tolerar (Bååth, 1992; Bååth et al., 1998). Este trabalho mostrou que a tolerância dos isolados D à maioria dos metais pesados e dos isolados A ao chumbo foi superior à tolerância evidenciada pelos isolados C. No entanto, contrariamente ao referido anteriormente, não se observou menor diversidade nas populações dos solos contaminados (BD e BA) (Capítulo 4). Estes resultados sugerem a existência de vários genótipos bem adaptados aos metais nos solos contaminados, provavelmente em resultado da contaminação progressiva e lenta que os solos da mina do Braçal sofreram.

Alguns autores consideram a existência de tolerância múltipla aos metais pesados ao nível das comunidades microbianas do solo (Chaudri et al., 1992a; Díaz-Raviña et al., 1994). Díaz-Raviña et al. (1994) verificaram que, geralmente, a contaminação por um único metal aumentava não só o nível de tolerância das bactérias a esse metal, como também os níveis de tolerância a outros metais, especialmente quando presentes no solo em elevadas concentrações. Neste trabalho, o descrito por estes autores foi apenas confirmando para o caso dos isolados D não se tendo verificado o mesmo para os isolados A, que embora tenham mostrado elevada tolerância ao Pb foram sensíveis aos restantes metais.

É importante salientar que neste estudo as concentrações de metais toleradas pela maioria dos isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* foram muito superiores às observadas noutros trabalhos (El-Aziz et al., 1991; Castro, 1999; Chaudri et al., 1992a; Matsuda et al., 2002). Contudo, os níveis de tolerância podem diferir muito de estudo para estudo uma vez que dependem da metodologia e do sal de metal usado e da própria sensibilidade das espécies bacterianas pertencentes à mesma família. A ligação dos iões metálicos aos compostos orgânicos encontrados na maior parte dos meios biológicos, leva a que a exposição aos iões metálicos livres seja muito menor do que a concentração total. Tal acontece quando se usam meios com tampões orgânicos como o MES e HEPES (Angle et al., 1993a). Por outro lado, o sal de metal utilizado também pode influenciar a tolerância. De acordo com Biró et al. (1995) o anião Cl^- forma com os iões metálicos compostos menos tóxicos do que o ião SO_4^- .

Vários autores também evidenciaram diferenças de tolerância a metais pesados entre rizóbios de crescimento lento e rizóbios de crescimento rápido (Borges e Wollum, 1980; Angle et al., 1993b). Estes autores sugerem que os isolados de *B. japonicum* causam reacção alcalina no meio o que reduz a biodisponibilidade dos metais, ao contrário dos rizóbios de crescimento rápido que acidificam o meio, solubilizando os metais (Matsuda et al., 2002). Giller et al. (1993) também verificaram que algumas estirpes de *Sinorhizobium meliloti* foram mais tolerantes aos metais do que as estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

Capítulo 6

Avaliação da sobrevivência de isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* em solos contaminados

6.1 Introdução

A influência dos metais pesados na sobrevivência do rizóbio e nas suas actividades, nomeadamente ao nível da fixação biológica de azoto, tem sido vastamente estudada ao longo das últimas décadas.

No entanto, a maioria dos trabalhos estudam os efeitos dos metais pesados em rizóbio através da adição de sais de metais em concentrações crescentes a meios nutritivos (Angle et al., 1993b; Kinkle et al., 1987; Matsuda et al., 2002; Pereira et al., 2006a,b), sendo as avaliações realizadas através do crescimento em placa, ou pela estimativa da tolerância em meio líquido, através de valores atribuídos aos padrões de crescimento (Mårtensson, 1992). Contudo, existem algumas limitações no uso de métodos *in vitro*, já que as concentrações dos iões metálicos livres e consequentemente as suas actividades reais não são conhecidas, uma vez que alguns metais podem ligar-se a componentes orgânicos que se encontram nos meios biológicos. Como consequência, as concentrações de metais toleradas podem não estar relacionadas com as concentrações reais encontradas nos habitats dos quais o rizóbio foi isolado. Por outro lado, existem outros factores ambientais como o pH e a matéria orgânica que podem conjuntamente com os metais influenciar o crescimento e sobrevivência do rizóbio e que não são testados neste tipo de estudos. Assim, a introdução de estirpes de rizóbio em solos irradiados contaminados naturalmente com metais permite avaliar de forma mais realista

a influência destes elementos na sobrevivência das populações de rizóbio ao longo do tempo.

Reddy et al. (1983) introduziram $9,0 \times 10^8$ células ml^{-1} da estirpe USDA 110 de *B. japonicum* em dois solos contendo diferentes conteúdos de lamas residuais e verificaram que após 42 dias menos de 1% do rizóbio tinha sido recuperado dos solos, tendo justificado esta perda com a presença de metais nas lamas. Mais tarde McGrath et al. (1988) verificaram que o rizóbio a crescer em solos com lamas residuais perdeu a capacidade de fixar azoto. Quando os mesmos solos contaminados foram inoculados com estirpes eficazes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* e incubados a 25 °C durante 2 meses, verificou-se que nos solos com 10^7 células ml^{-1} o rizóbio não conseguia nodular eficazmente o trevo. Contudo, a inoculação com um maior número de células permitiu que alguns rizóbios sobrevivessem e nodulassem eficazmente o trevo (Giller et al., 1989). Estes autores consideraram que as estirpes de rizóbio eficazes não eram capazes de sobreviver em estado livre, ou seja fora do ambiente protector do nódulo nos solos contaminados.

Chaudri et al. (1992b) observaram a sobrevivência da população indígena de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* em solos previamente tratados com lamas residuais, contaminadas com metais ao longo de 18 meses. Ao fim deste tempo verificaram que o número de rizóbios tinha decrescido 99% nos solos com concentrações de Zn, Cu e Cd iguais a 390, 127 e 12 mg kg^{-1} , respectivamente.

A sobrevivência de estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* em solos com diferentes doses de lamas residuais também foi avaliada por Giller et al. (1993) ao longo de 171 dias. Estes autores concluíram que o número de rizóbios decresceu significativamente ao fim deste período em todos os solos contaminados para valores < 10^4 células g^{-1} de solo, enquanto que no solo controlo o número de rizóbio foi sempre superior a 10^6 células g^{-1} de solo. As concentrações de metais presentes nestes solos estavam próximas dos limites impostos por lei pela União Europeia para os solos com aplicação de lamas residuais.

Mais recentemente, Castro et al. (2003) observaram a sobrevivência ao longo de 18 meses de estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* isoladas de solos contaminados e

não contaminados. Estes autores concluíram que a redução do tamanho das populações só foi afectada após 12 meses e apenas nas estirpes provenientes dos solos não contaminados. Após 18 meses observaram um decréscimo no número de rizóbios em todas as estirpes testadas.

Deste modo, este capítulo teve como principais objectivos:

- Avaliar a sobrevivência de 8 isolados de rizóbio ao longo de 12 meses, após a inoculação no solo controlo (BC) e nos dois solos contaminados (BD e BA).
- Relacionar a sobrevivência com os níveis de contaminação dos solos.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Irradiação dos solos

Os diferentes solos foram secos a 40 °C e separados em pequenas porções de 50 g em sacos de plástico fechados e irradiados na Unidade de Tecnologia de radiação do INETI, tendo sido utilizada radiação γ , proveniente de uma fonte de Colbalto-60 (Mendes et al., 1990). As amostras foram submetidas a dois tratamentos de radiação. No primeiro foi absorvida uma dose de 7,0 KGy, que corresponde à dose necessária para eliminar organismos patogénicos (*Escherichia coli*, salmonelas e quistos de parasitas). Em seguida procedeu-se a um novo tratamento cuja dose absorvida foi de 25,0 KGy correspondendo à esterilização clínica e que é seguida nesta unidade para a esterilização de material hospitalar (comunicação pessoal).

6.2.2 Material biológico

Nesta tarefa utilizaram-se 8 isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* que foram obtidos dos nódulos das plantas de trevo branco crescidas nos diferentes solos. A escolha destes isolados baseou-se na sua origem, na presença do gene *nodC*, na eficácia simbiótica relativa (%), no número de plasmídeos e nos grupos formados em resultado da análise dos perfis de REP e ERIC-PCR para 75% de semelhança (Tabela 6.1). Os 8 isolados foram inoculados quer no solo controlo (BC) quer nos solos mais contaminados (BA e BD).

Tabela 6.1 – Origem e características dos isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* introduzidos nos solos irradiados.

Isolados	Origem (solo)	<i>nod C</i>	ESR (%)	Nº plasmídeos	Grupo REP e ERIC-PCR
C 1-2	Solo controlo (BC)	+	57	8	I
C 2-1	Solo controlo (BC)	+	17	4	VIII
C 3-1	Solo controlo (BC)	+	0	2	V
C 3-4	Solo controlo (BC)	+	0	2	IV
D 1-3	Medianamente contaminado (BD)	-	-	1	IV
D 2-2	Medianamente contaminado (BD)	+	35	3	III
A 14-2	Muito contaminado (BA)	-	-	0	VI
A 17-3	Muito contaminado (BA)	-	-	2	VII

6.2.3 Inoculação dos solos irradiados com os isolados de rizóbio

Pesou-se 20 g de cada solo irradiado (BC, BD e BA) para frascos de vidro esterilizados seguindo-se a inoculação dos mesmos com cada um dos isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* seleccionados anteriormente (Tabela 6.1). As suspensões de células de *Rhizobium* foram obtidas através do crescimento dos diferentes isolados em meio ML líquido durante 3 dias a 28 °C. A quantidade de inóculo foi ajustada de modo a obter-se uma concentração final de 10^9 células g⁻¹ de solo. Os solos foram ajustados a 50% da capacidade de retenção de água. Após a inoculação os frascos foram fechados e colocados no escuro a 15 °C. Foram realizadas 3 réplicas para cada conjunto solo-isolado e como controlos utilizaram-se os três tipos de solos (BC, BD e BA) não inoculados que foram designados por tratamentos T0.

6.2.4 Avaliação da sobrevivência

O número de rizóbios sobreviventes foi estimado usando a técnica de contagem por placas tendo-se realizado diluições em série de 1/10 em água destilada a partir de 1 g de solo. A contagem foi realizada em placas de meio ML com duas camadas. A primeira camada continha 1,5% (m/v) de agar, à qual foi adicionado 1 ml de cada diluição seguindo-se a colocação de uma segunda camada (2,5 ml) com 0,75% (m/v) de agar. Esta técnica permitiu uma melhor separação das células facilitando a posterior contagem das colónias formadas. As placas foram feitas em triplicado e incubadas a 28 °C, tendo-se procedido às contagens entre o 3º e o 6º dia. O número de células viáveis foi expresso em células g⁻¹ de solo. De seguida procedeu-se a uma transformação logarítmica de modo permitir uma melhor interpretação dos resultados.

A primeira estimativa da sobrevivência foi realizada aos 3 meses após a inoculação dos solos e as seguintes aos 6, 9 e 12 meses. A avaliação da sobrevivência aos 6 meses foi também estimada pelo método do NMP usando o trevo branco como planta hospedeira seguindo a metodologia descrita em 3.2.1.

6.3 Resultados

6.3.1 Sobrevivência das populações de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* introduzidas nos solos irradiados

A sobrevivência dos diferentes isolados inoculados nos solos irradiados foi analisada através da contagem do número de células viáveis em placa aos 3, 6, 9 e 12 meses. Aos 6 meses o tamanho das populações também foi analisado através do NMP para todos os isolados, com exceção dos isolados D 1-3, A 14-2 e A 17-3 que perderam a capacidade de nodular a planta hospedeira. Os resultados obtidos com a técnica do NMP foram semelhantes aos obtidos com a contagem em placas. Uma vez que a determinação do número de rizóbios através do NMP só foi realizada aos 6 meses optou-se por apresentar apenas os resultados das contagens em placa ao longo do tempo (3, 6, 9 e 12 meses).

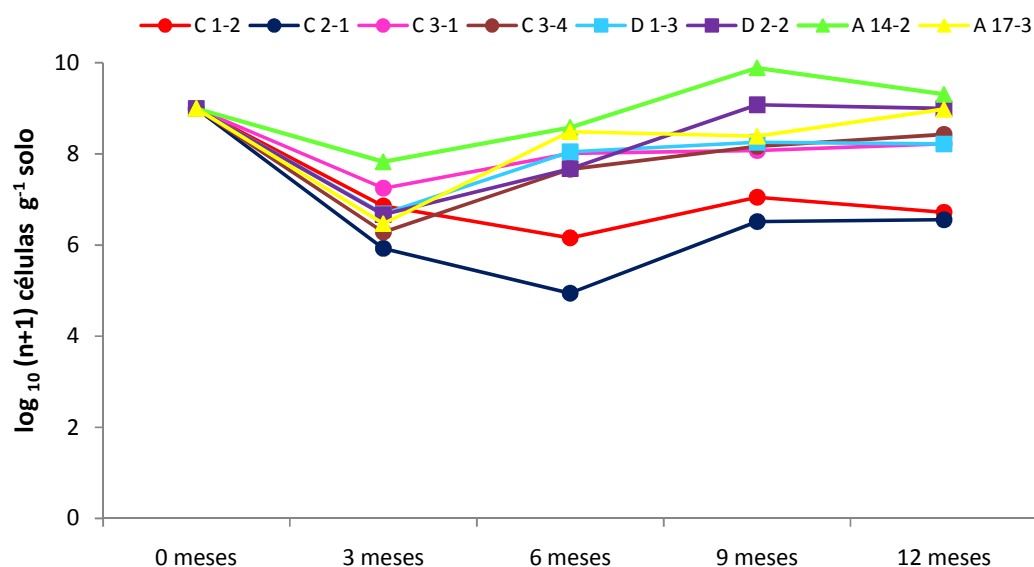


Figura 6.1 – Sobrevivência dos 8 isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* inoculados no solo controle (BC) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9 e 12 meses).

Na Figura 6.1 podemos observar a sobrevivência ao longo de 12 meses dos diferentes isolados de rizóbio inoculados no solo controle (BC). Foi possível constatar que as populações de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* introduzidas neste solo diminuiram

significativamente 3 meses após a inoculação, embora a redução no número de bactérias tenha sido diferente entre isolados. O isolado C 2-1 foi o mais afectado, com uma redução do número de células para valores de $8,52 \times 10^5$ células g^{-1} de solo. Os isolados C 3-1 e A 14-2 foram os menos afectados, uma vez que o número de células diminuiu apenas para $1,76 \times 10^7$ e $6,71 \times 10^7$ células g^{-1} de solo, respectivamente. Aos 6 meses o número de bactérias determinadas nos solos inoculados com os isolados C 1-2 e C 2-1 voltou a diminuir, enquanto as restantes populações aumentaram o seu número para valores superiores a 10^7 células g^{-1} de solo. Aos 9 meses as populações dos isolados D 2-2 e A 14-2 aumentaram substancialmente ultrapassando o número de rizóbios inicialmente introduzidos no solo. As populações dos isolados C 1-2 e C 2-1 conseguiram recuperar apresentando valores iguais a $1,1 \times 10^7$ e $3,3 \times 10^6$ células g^{-1} de solo, respectivamente. Após 12 meses, o número de rizóbios manteve-se igual ao observado aos 9 meses para a maioria dos isolados. No entanto, verificou-se uma ligeira redução na dimensão da população do isolado A 14-2 e um ligeiro aumento para o isolado A 17-3.

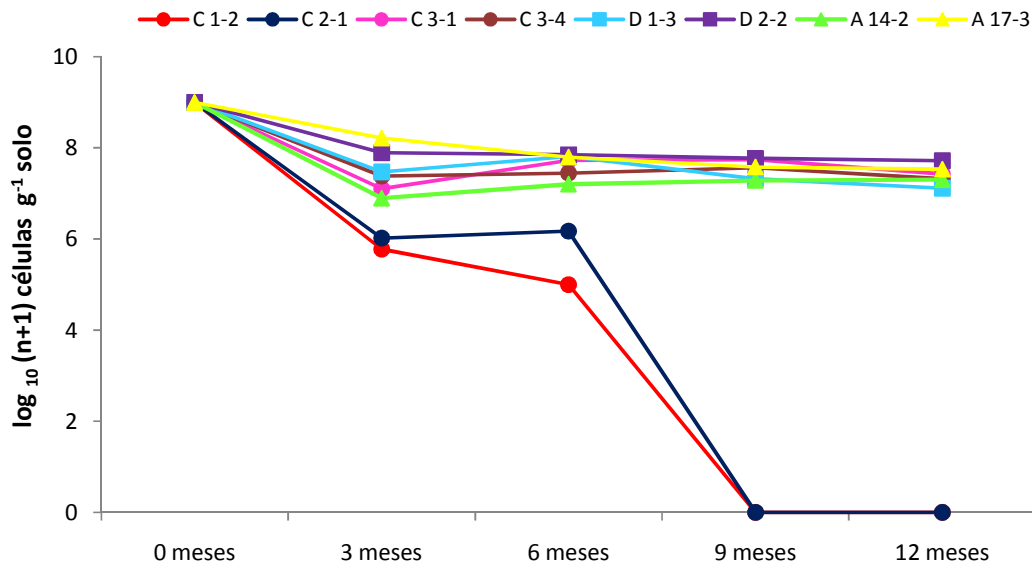


Figura 6.2 – Sobrevivência dos 8 isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* inoculados no solo contaminado (BD) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9 e 12 meses).

Na Figura 6.2 é possível observar a sobrevivência dos diferentes isolados inoculados no solo medianamente contaminado (BD). Neste solo, a sobrevivência dos

isolados foi mais afectada do que no solo BC, uma vez que o tamanho das diferentes populações foi diminuindo ao longo dos 12 meses para todos os isolados sem que ocorresse qualquer recuperação para valores próximos dos inicialmente inoculados. Os isolados C 1-2 e C 2-1 foram os mais afectados já que aos 9 e 12 meses não foram detectados rizóbios nos solos inoculados com estes dois isolados. A dimensão das populações dos restantes isolados diminuiu após 3 meses para valores próximos das 10^7 células g^{-1} de solo, tendo mantido valores semelhantes após 6, 9 e 12 meses. Não se observaram grandes diferenças de sobrevivência entre os isolados C 3-1 e C 3-4, provenientes do solo controlo, e os isolados originários dos solos contaminados (D 1-3, A 14-2 e A 17-3), com excepção do isolado D 2-2 onde a redução do número de rizóbios ao longo dos 12 meses não foi tão severa.

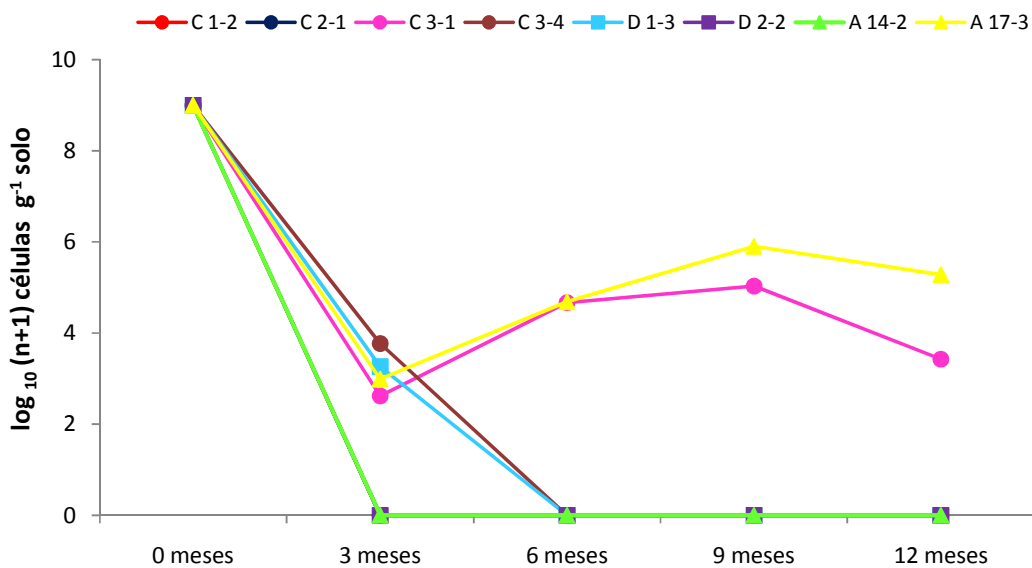


Figura 6.3 – Sobrevivência dos 8 isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* inoculados no solo muito contaminado (BA) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9 e 12 meses).

A sobrevivência dos diferentes isolados no solo muito contaminado (BA) está apresentada na Figura 6.3. A sobrevivência dos isolados foi muito afectada neste solo, uma vez que apenas foi possível detectar aos 3 meses rizóbios viáveis nos solos inoculados com os isolados C 3-1, C 3-4, D 1-3 e A 17-3. Contudo, os isolados C 3-4 e D 1-3 apenas conseguiram sobreviver até aos 3 meses sendo o número de rizóbios muito baixo

$5,91 \times 10^3$ e $1,83 \times 10^3$ células g^{-1} de solo, respectivamente. Os isolados C 3-1 e A17-3 conseguiram recuperar para valores de $1,07 \times 10^5$ e $8,04 \times 10^5$ células g^{-1} de solo, respectivamente, após 9 meses. No entanto, aos 12 meses verificou-se uma redução no número de rizóbios destes dois isolados, principalmente para o isolado C 3-1.

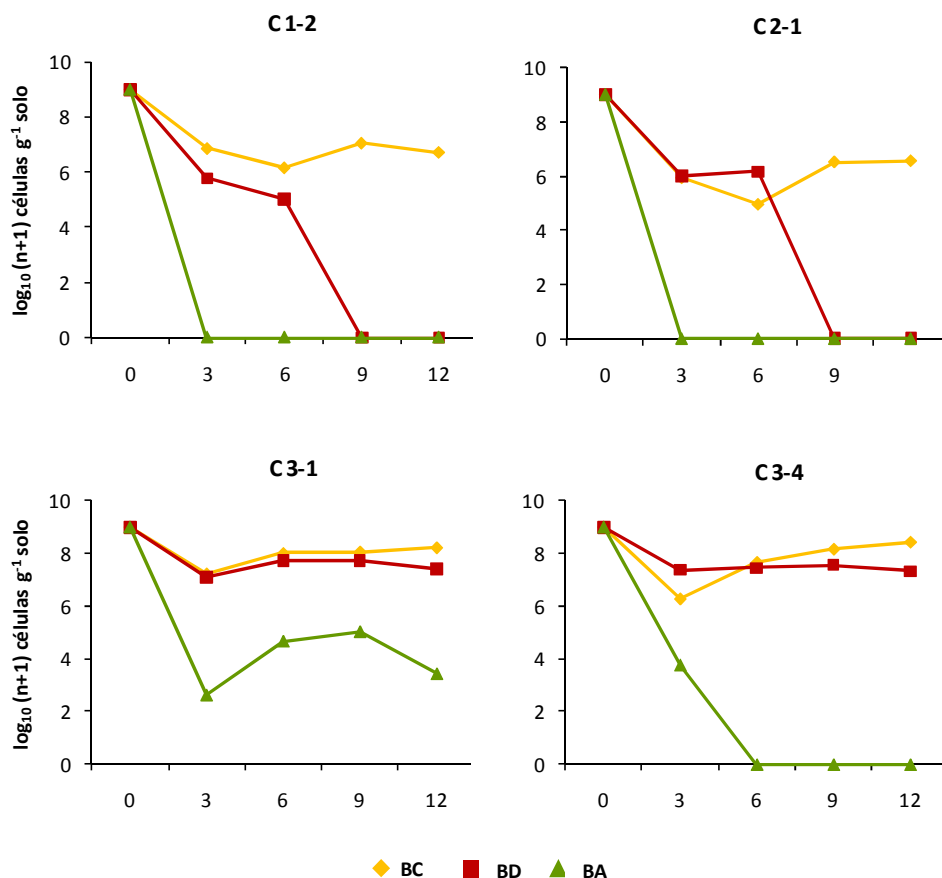


Figura 6.4 – Comportamento ao longo do tempo das estirpes isoladas do solo BC (controlo) nos 3 solos testados (BC, BD e BA).

Na Figura 6.4 podemos observar o comportamento das estirpes C (isoladas do solo controlo) quando inoculadas nos diferentes solos. A sobrevivência das estirpes C 1-2 e C 2-1 foi fortemente afectada quando inoculadas nos solos mais contaminados (BD e BA). Ambas as estirpes não conseguiram sobreviver no solo BA, uma vez que após 3 meses não se detectaram rizóbios neste solo. No solo BD, após 6 meses o número de rizóbios também foi significativamente reduzido não se tendo determinado células viáveis ao fim

de 9 e 12 meses. No solo controlo, embora o número de rizóbios tenha diminuído após 6 meses, estes isolados conseguiram recuperar ligeiramente ao fim de 9 e 12 meses. O comportamento dos isolados C 3-1 e C 3-4 foi muito semelhante no solo controlo e no solo contaminado (BD). Ambos os isolados conseguiram sobreviver no solo muito contaminado (BA). No entanto, no caso do isolado C 3-4 não se determinaram rizóbios viáveis após 6 meses. O isolado C 3-1 mostrou uma boa recuperação após 6 meses onde o número de rizóbios determinado foi superior a 10^4 células g^{-1} de solo.

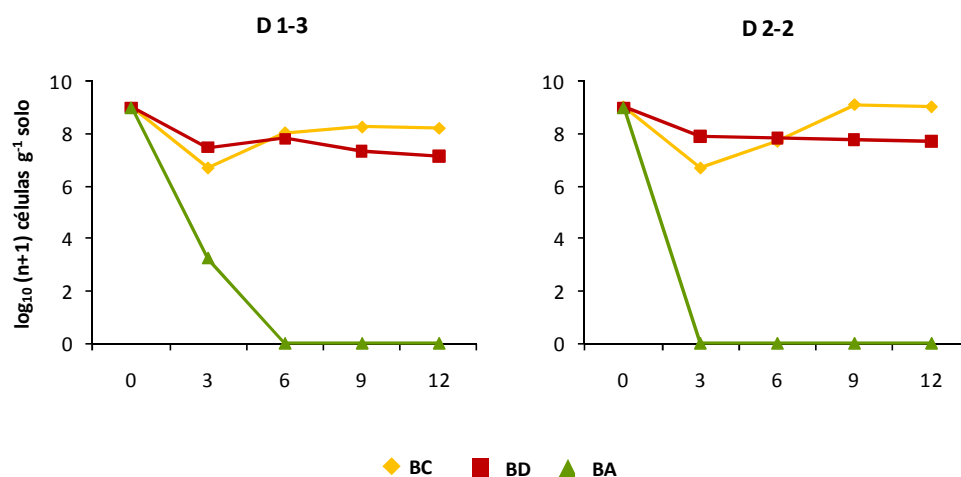


Figura 6.5 – Comportamento ao longo do tempo das estirpes isoladas do solo BD (medianamente contaminado) nos 3 solos testados (BC, BD e BA).

Os isolados D 1-3 e D 2-2 provenientes do local medianamente contaminado (BD) quando introduzidos no solo BC e no solo BD tiveram comportamentos ligeiramente diferentes (Figura 6.5). No solo medianamente contaminado (BD) a dimensão das populações diminuiu sempre ao longo dos 12 meses, embora no isolado D 2-2 essa redução não tenha sido tão severa como para o isolado D 1-3. Contrariamente, no solo BC após uma redução da população nos 3 primeiros meses observou-se uma recuperação do número de rizóbios para valores próximos do número de células introduzidas inicialmente. O isolado D 1-3 conseguiu sobreviver no solo BA nos primeiros 3 meses não se tendo detectado células viáveis nos meses seguintes (6, 9 e 12 meses). Pelo contrário, o isolado D 2-2 não conseguiu sobreviver no solo muito contaminado (BA).

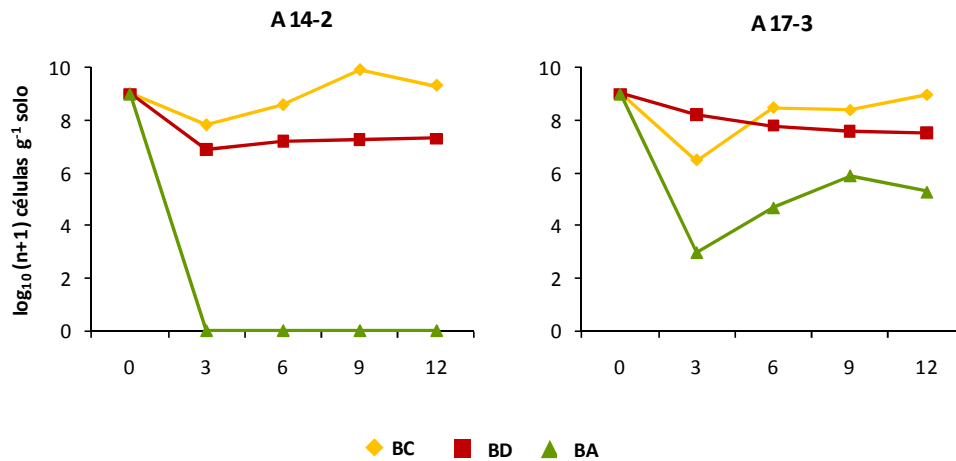


Figura 6.6 – Comportamento ao longo do tempo das estirpes isoladas do solo BA (muito contaminado) nos 3 solos testados (BC, BD e BA).

O isolado A 14-2 teve um comportamento diferente no solo BC e no solo BD. Ao fim de 3 meses observou-se uma redução no número de rizóbios do isolado A 14-2 em ambos os solos. No entanto, no solo BC este isolado conseguiu recuperar, uma vez que passados 12 meses o número de células foi ligeiramente superior ao inoculado, ao contrário do verificado para o solo BD onde o tamanho da população se manteve em 10^7 células g⁻¹ de solo até aos 12 meses. O isolado A 14-2 não conseguiu sobreviver no solo muito contaminado (BA). A sobrevivência do isolado A 17-3 também variou consoante o solo. No solo BC, após 3 meses observou-se uma redução no número de rizóbios, no entanto no final dos 12 meses o número de rizóbios determinado foi similar ao inicialmente inoculado. No solo BD o número de rizóbios foi diminuindo ao longo dos 12 meses. Este isolado conseguiu sobreviver no solo BA e o seu comportamento revelou uma grande capacidade de adaptação, uma vez que após uma redução drástica aos 3 meses conseguiu recuperar e atingir as $1,92 \times 10^5$ células g⁻¹ de solo aos 12 meses.

6.4 Discussão

A introdução de estirpes de rizóbio separadamente em solos irradiados permitiu-nos estudar o seu comportamento sem competição com outras bactérias. Esta metodologia dá a todas as estirpes a mesma oportunidade de sobreviverem e se adaptarem ao stresse imposto pelos metais pesados em solos contaminados.

Independentemente do solo, o número de células de todas as estirpes diminuiu 3 meses após a inoculação (Figura 6.1, 6.2 e 6.3). Este resultado sugere que os isolados tiveram necessidade de se adaptar às novas condições de crescimento. A diminuição do número de células pode ser explicada pela reduzida disponibilidade de nutrientes no solo face à encontrada nos meios de cultura. Além disso, o pH destes solos é bastante ácido e abaixo do pH óptimo de crescimento do rizóbio o que pode ter dificultado a adaptação das bactérias inoculadas. Giller et al. (1993) também verificaram uma diminuição no número de rizóbios após 3 meses quer no solo controlo quer nos solos contaminados. No entanto, Castro et al. (2003) obtiveram resultados muito diferentes uma vez que a dimensão das populações de rizóbio aumentou nos primeiros 6 meses em ambos os solos (contaminado e não contaminado).

Foi possível observar que a sobrevivência dos isolados inoculados no solo BC foi menos afectada do que nos solos BD e BA. No solo BC, todos os isolados com excepção dos isolados C 1-2 e C 2-1, após um período de adaptação (3 meses) conseguiram recuperar as suas taxas de reprodução e estabilizar o tamanho das suas populações, para um número de células próximo do inicialmente inoculado (Figura 6.1). Pelo contrário no solo medianamente contaminado (BD) o número de rizóbios diminuiu sempre ao longo do tempo para todos os isolados testados (Figura 6.2). Estes resultados sugerem que as condições físico-químicas do solo BD impuseram maior stresse ao rizóbio afectando a sua sobrevivência ao longo do tempo. Um dos factores que pode influenciar directamente a sobrevivência do rizóbio nos solos é o pH (Hirsch, 1996; Ibekwe et al., 1995). No entanto, este factor não parece estar na base da menor sobrevivência do rizóbio no solo BD, uma vez que o pH foi semelhante no solo BC e BD ($\approx 5,0$), e no solo BC a maioria dos isolados conseguiu adaptar-se de forma a recuperar e atingir o número de rizóbios inicialmente inoculados. O que realmente distingue estes dois solos é a contaminação por metais

pesados. No solo BD, as concentrações de metais estão muito acima do máximo permitido por lei, especialmente para os metais não essenciais Cd e Pb e para o metalóide As (Tabela 2.4 - Capítulo 2). Deste modo, a diminuição do número de rizóbios no solo BD ao longo dos 12 meses está certamente relacionada com as concentrações elevadas de metais pesados presentes neste solo. Adicionalmente, o pH ácido do solo BD potencia o aumento da biodisponibilidade dos iões metálicos e consequentemente o aumento dos efeitos tóxicos no rizóbio.

As estirpes C 1-2 e C 2-1 tiveram grandes dificuldades de adaptação às condições impostas pelos diferentes solos. Seria de esperar que estes isolados estivessem bem adaptados às condições do solo BC uma vez que são provenientes deste local. Contudo, tal facto não se verificou e o número de células destes dois isolados foi sempre reduzido ao longo dos 12 meses em comparação com o observado para os restantes isolados (Figura 6.1). As concentrações de metais pesados no solo BC foram reduzidas e estão abaixo dos limites baixos impostos por lei, com excepção do Pb (Tabela 2.4 – Capítulo 2). No entanto, Chaudri et al. (1992a) concluíram que mesmo em concentrações reduzidas os metais podem afectar a sobrevivência dos isolados mais sensíveis, como é o caso das estirpes C 1-2 e C 2-1. Por outro lado, é importante referir a ausência da planta hospedeira nestes ensaios o que pode ter interferido com a sobrevivência destes isolados. Vários autores referem a importância da planta hospedeira na sobrevivência do rizóbio, sobretudo nos solos mais contaminados, uma vez que confere protecção à população rizobiana levando ao aumento do número de rizóbios nos solos (Giller et al., 1993; Hirsch et al., 1993; Hirsch, 1996). No solo BD a sobrevivência das estirpes C 1-2 e C 2-1 foi ainda mais afectada, uma vez que aos 9 e 12 meses não se detectaram rizóbios viáveis no solo (Figuras 6.2 e 6.4), provavelmente devido às elevadas concentrações de metais existentes neste solo. A reduzida sobrevivência dos isolados C 1-2 e C 2-1 nos solos irradiados confirmou os resultados obtidos em meio artificial. Ambas as estirpes mostraram grande sensibilidade ao Cd e ao Pb (Figura 5.4 e 5.5 - Capítulo 5), dois metais não essenciais presentes em concentrações elevadas nos solos irradiados.

Os metais pesados presentes nos solos influenciaram não só a sobrevivência como também a capacidade de fixar azoto de algumas estirpes. Aos 6 meses avaliou-se a

capacidade simbiótica dos isolados C 1-2, C 2-1, C 3-1, C 3-4 e D 2-2 e verificou-se que os isolados C 1-2 e C 2-1 tornaram-se ineficazes, mesmo no solo pouco contaminado. Giller et al. (1989) também observaram que as estirpes de rizóbio eficazes tinham grandes dificuldades em sobreviver em estado livre, ou seja fora do ambiente protector do nódulo nos solos contaminados. De acordo com Giller et al. (2009) o custo energético de sobreviver em condições ambientais desfavoráveis é muito elevado o que leva a que organismos não consigam realizar outras actividades que não estejam directamente relacionadas com a sobrevivência, como é o caso da fixação de azoto. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam esta hipótese e justificam de certo modo a reduzida existência de bactérias com boa capacidade simbiótica nos solos contaminados.

Ao contrário do verificado para os isolados C 1-2 e C 2-1 o isolado D 2-2 conseguiu manter a eficácia simbiótica após 6 meses. A população do isolado D 2-2 no solo BD manteve-se mais estável do que os restantes isolados ao longo dos 12 meses sem ter sofrido uma redução abrupta do número de células (Figura 6.2). Por outro lado, este isolado quando crescido em meio artificial suplementado com diferentes concentrações de Cd e Pb revelou uma boa tolerância ao Pb e moderada ao Cd em comparação com os restantes isolados inoculados nos solos irradiados (Figuras 5.4 e 5.5 – Capítulo 5). Estes resultados poderão explicar o seu comportamento quando inoculado no solo medianamente contaminado.

A sobrevivência do rizóbio no solo BA foi fortemente afectada e apenas 4 isolados conseguiram sobreviver neste solo (C 3-1, C 3-4, D 1-3 e A 17-3) após 3 meses, e apenas dois (C 3-1 e A17-3) conseguiram sobreviver ao fim dos 12 meses, embora com um número reduzido de células (Figura 6.3). As condições adversas do solo BA podem justificar a incapacidade do rizóbio de sobreviver neste solo. O solo BA além das elevadas concentrações de metais, possui características físico-químicas muito adversas como um pH muito ácido (4,15) e baixo conteúdo em matéria orgânica (4,72%), o que afecta de forma directa os microrganismos e por outro lado, aumenta a biodisponibilidade dos metais, magnificando a sua toxicidade. Os isolados C 3-1, C 3-4 e A 17-3 conseguiram sobreviver neste solo e possuem um plasmídeo comum com peso molecular aproximado de 669 kb. Este plasmídeo poderá estar na base da sobrevivência destes isolados num

solo com concentrações tão elevadas de metais, como é o caso do solo BA. Por outro lado, em meio artificial os isolados C 3-4 e A 17-3 mostraram tolerância elevada ao Cd e Pb, enquanto os isolados C 3-1 e D 1-3 mostraram elevada tolerância ao Pb e moderada ao Cd (Figuras 5.4 e 5.5). Estes resultados indicam que estes 4 isolados possuem mecanismos de tolerância a metais que lhes permite sobreviver em solos muito contaminados, como é o caso do solo BA. Curiosamente, os isolados C 3-1 e C 3-4 são originários do solo BC, no entanto conseguiram sobreviver nos solos mais contaminados (BD e BA) revelando grande capacidade de adaptação às elevadas concentrações de metais pesados. Estes resultados estão de acordo com Hada e Sizemore (1981) que mostraram que os solos não poluídos podem conter organismos tolerantes ou organismos que rapidamente se adaptam às elevadas concentrações de metais nos solos.

Capítulo 7

O stresse oxidativo provocado pelo cádmio

7.1 Introdução

O stresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS, do inglês “reactive oxygen species”) e o sistema antioxidante dos organismos (Foyer e Noctor, 2003). As espécies reactivas de oxigénio são uma consequência natural do metabolismo aeróbio (Cash et al., 2007). Deste modo, e devido à sua toxicidade, as suas concentrações devem permanecer baixas no interior das células (Lushchak, 2001).

7.1.1 Espécies reactivas de oxigénio e danos celulares

Os organismos aeróbios usam o oxigénio molecular (O_2) para a respiração e para a oxidação de nutrientes para obterem energia (González-Flecha e Demple, 1995). Embora o O_2 por si só não cause qualquer tipo de dano para as células aeróbias (Fridovich, 1998; Hippeli et al., 1999; Storz e Imlay, 1999), a maioria dos ROS deriva de reduções sequenciais univalentes do O_2 por enzimas da cadeia respiratória (González-Flecha e Demple, 1995). De acordo com González-Flecha e Demple (1995), em *E. coli* a cadeia respiratória é responsável pela produção de 87% do H_2O_2 total produzido na célula. Dentro dos ROS destacam-se o radical superóxido (O_2^-) que apresenta um tempo de vida muito reduzido, o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) que é uma molécula com um tempo de vida relativamente longo e que pode difundir-se a partir do seu local de produção (Levine

et al., 1994; Willekens et al., 1997) e o radical hidroxilo (OH^\cdot) que apresenta um potencial oxidante muito forte embora tenha um tempo de vida muito curto (Foyer et al., 1994).

Os metais pesados podem promover a formação directa ou indirecta de ROS através de: (1) transferência directa de electrões, envolvendo catiões metálicos (2) interferência nas vias metabólicas, (3) inactivação e diminuição da expressão das enzimas antioxidantes, (4) e depleção de antioxidantes de baixo peso molecular, como a glutathione (GSH) (Cho e Park, 2000; Halliwell e Gutteridge, 1984; Zhou et al., 2008).

A formação excessiva de ROS pode originar danos oxidativos em várias macromoléculas, nomeadamente lípidos, proteínas e ácidos nucleicos (Apel e Hirt, 2004; Farr e Kogoma, 1991; Gallego et al., 2002; Lushchak, 2001). Os lípidos são um dos principais alvos dos ROS. Os radicais livres atacam directamente os ácidos gordos polinsaturados nas membranas e iniciam a peroxidação lipídica. Um dos primeiros efeitos é a perda de fluidez da membrana e a destruição das proteínas membranares. Os ácidos gordos polinsaturados são degradados em vários produtos, como os aldeídos que são extremamente reactivos e podem danificar as proteínas (Humpries e Sweda, 1998). Além de serem radicais reactivos, os aldeídos têm um tempo de vida elevado e podem difundir-se para outros locais distantes do local de origem atacando alvos celulares, actuando como mensageiros tóxicos secundários. Dos vários aldeídos formados durante a peroxidação lipídica o malonaldeído (MDA) é o mais estudado (Esterbauer et al., 1991).

As proteínas também são danificadas pelos ROS, tendo sido já documentados várias classes de danos, incluindo a oxidação de grupos sulfidril, redução de bissulfitos, reacção com aldeídos e fragmentação de péptidos (Stadman, 1990). A oxidação proteica é definida como uma modificação covalente nas proteínas, induzida por ROS ou por subprodutos do stresse oxidativo, sendo esta modificação normalmente irreversível (Ghezzi e Bonetto, 2003). Os ácidos nucleicos também são alvo dos danos induzidos pelo stresse oxidativo. No entanto, devido à elevada estabilidade destas macromoléculas apenas o radical hidroxilo consegue oxidar o DNA e o RNA.

7.1.2 O sistema de defesa antioxidante

As bactérias possuem vários sistemas de defesa enzimáticos e não enzimáticos de modo a manterem o estado redox da célula e consequentemente minimizar os danos oxidativos que o aumento de ROS pode originar (Apel e Hirt, 2004; Foyer e Noctor, 2003; Lushchak, 2001).

O sistema de defesa não enzimático das bactérias é constituído por moléculas antioxidantes como a glutathione (Sundquist et al., 1989; Zeller e Klug, 2006). A GSH é um dos antioxidantes mais eficientes, desempenhando funções fisiológicas importantes, nomeadamente ao nível da regulação redox, conjugação de metabolitos, desintoxicação de xenobióticos, homeostase celular e da sinalização celular, induzindo respostas adaptativas (Noctor et al., 2002). Na presença de stresse oxidativo, a GSH reage quimicamente com os ROS, actuando directamente como agente antioxidante (Israr e Sahi, 2006). Sob condições extremas de stresse, a concentração intracelular de glutathione oxidada (GSSG) aumenta concomitantemente com o decréscimo de GSH (Corticeiro et al., 2006). Uma taxa elevada de GSH/GSSG é fundamental à manutenção da glutathione como agente antioxidante (Corticeiro et al., 2006), pois um decréscimo poderá comprometer o estado redox da célula.

Os mecanismos de defesa enzimática incluem várias enzimas antioxidantes que eliminam o excesso de ROS e consequentemente diminuem o stresse oxidativo da célula (Figura 7.1). Destas fazem parte integrante a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (Gratão et al., 2005; Noctor e Foyer, 1998; Wood e Sørensen, 2001).

As superóxido dismutases são metaloenzimas que catalisam a dismutação do O_2^- a H_2O_2 e O_2 , actuando como a primeira linha de defesa enzimática contra os ROS (Alscher et al., 2002; Bowler et al., 1992; Davies, 2000; Gerlach et al., 1998). Estas enzimas foram encontradas em praticamente todos os organismos examinados até à data e desempenham um papel muito importante na defesa contra o stresse oxidativo. Nas bactérias existem 3 classes de SODs que diferem nos seus cofactores metálicos. A Mn-SOD e a Fe-SOD que estão localizadas no citoplasma e a Cu/Zn-SOD que está no periplasma (Davies, 2000). Existem ainda evidências de uma quarta classe de SOD cujo

cofactor é o níquel e que foi encontrada em *Streptomyces griseus* e em *Streptomyces coelicolor* (Kim et al., 1998; Youn et al., 1996). No entanto, a acção da SOD leva a um aumento de H_2O_2 na célula, e uma vez que este também é tóxico, é necessário eliminá-lo em reacções subsequentes. Nas bactérias, existem várias enzimas responsáveis pela eliminação do H_2O_2 , sendo as mais importantes a CAT e a GPx (Corticeiro et al., 2006; Davies, 2000; Hidalgo et al., 2004).

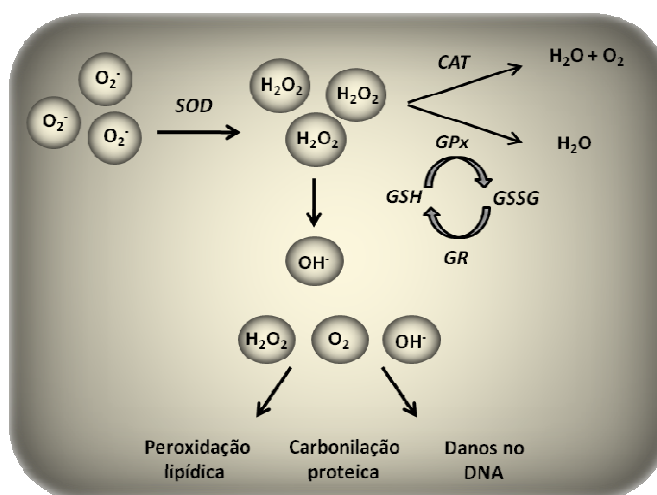


Figura 7.1 - Stresse oxidativo e sistema enzimático de defesa antioxidante. As espécies reativas de oxigénio (ROS) são formadas na presença de metais. A eliminação do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 é efectuada pela acção de várias enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). O radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ é convertido em H_2O_2 por acção da SOD, que consequentemente é eliminado pela CAT e GPx. A GPx elimina o H_2O_2 usando glutathione (GSH) como agente redutor. A ineficácia do sistema antioxidante promove um aumento de ROS, originando vários danos oxidativos, nomeadamente: peroxidação lipídica, danos no DNA e oxidação proteica.

Relativamente à acção da SOD e da CAT em bactérias pertencentes à família das *Rhizobiaceae* os estudos realizados focam-se sobretudo ao nível da simbiose rizóbio-leguminosa. A enzima chave para a fixação de azoto, a nitrogenase, é rapidamente inactivada na presença de oxigénio. Para evitar esta inactivação existe uma barreira de difusão nas células do córtex dos nódulos que limita a permeabilidade do oxigénio, que é libertado nos bacteroides pela leghemoglobina. Além deste sistema eficiente para reduzir a difusão e excesso de O_2 no bacteroide, a respiração ocorre numa taxa muito elevada de

modo a fornecer energia para a redução do azoto. Este processo leva à produção de ROS como O_2^- e peróxido de hidrogénio (Santos et al., 2001). Em *Sinorhizobium meliloti* a dismutação do O_2^- a H_2O_2 é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SodA) (Santos et al., 1999). Santos et al. (2000) mostraram que a disrupção do gene *sodA* afecta as propriedades simbióticas do *S. meliloti* e as bactérias mutantes perdem a capacidade de nodular e fixar azoto. Vários autores mostraram que as bactérias provenientes dos nódulos apresentam maior susceptibilidade ao H_2O_2 do que outras bactérias aeróbias (Hérouart et al., 1996; Ohwada et al., 1999). A análise em géis nativos das enzimas que actuam no H_2O_2 revelou que em *S. meliloti* a dismutação do H_2O_2 em O_2 e água ocorre através da acção de 3 catalases diferentes, 2 catalases monofuncionais (KatA e KatC) e a KatB que possui função dupla de catalase e peroxidase (Hérouart et al., 1996). A análise de outras bactérias como o *Bradyrhizobium japonicum*, *S. fredii*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, em géis nativos também revelaram a presença de 3 catalases. Contudo, o papel de cada catalase na resposta das bactérias ao stresse oxidativo ainda não é bem conhecido.

O stresse oxidativo é também uma consequência da exposição das células a metais pesados. O cádmio é um metal pesado relativamente abundante que nas últimas décadas tem sido utilizado em grande escala e faz parte da lista de poluentes prioritários pela Agência de Protecção Ambiental Americana (Waisberg et al., 2003). Dentro dos efeitos biológicos provocados por este metal podemos salientar a inibição da reparação do DNA, interferência com o sistema antioxidante, inibição da metilação do DNA, disrupção da célula e indução de apoptose (Stohs e Bagchi, 1995; Waisberg et al., 2003).

Uma vez que o cádmio não é um metal redox activo, pensa-se que este metal pode provocar stresse oxidativo indirectamente através da substituição de metais redox activos, pela depleção dos antioxidantes endógenos (ex. GSH) ou afectando a actividade das enzimas antioxidantes (Avery, 2001; Ercal et al., 2001; Liu et al., 2005; Stohs et al., 2001).

Os locais contaminados com metais pesados são, por si só, excelentes candidatos para analisar os sistemas antioxidantes responsáveis pelas adaptações fisiológicas das bactérias que habitam nestes ambientes. As bactérias presentes nos solos contaminados

podem desenvolver vários mecanismos para lidar com a toxicidade exercida por estes elementos. O nível de tolerância e o grau de adaptação destas espécies são extremamente variáveis. Existe uma extensa informação sobre os efeitos dos metais em bactérias. Contudo, estudos sobre o efeito dos metais no stresse oxidativo, bem como a resposta das defesas antioxidantes ainda estão por compreender. O cádmio foi o metal não essencial que provocou maior toxicidade nos isolados de rizóbio testados em meio artificial, uma vez que as concentrações toleradas foram muito inferiores às concentrações de chumbo e arsénio suportadas pelos diferentes isolados. Por este motivo o cádmio foi o metal escolhido para analisar o stresse oxidativo e o sistema de resposta antioxidante em rizóbio.

Neste contexto, os principais objectivos deste capítulo foram:

- Averiguar o potencial do cádmio para induzir stresse oxidativo nos isolados de rizóbio;
- Determinar os níveis de ROS (H_2O_2) na presença e ausência de cádmio;
- Avaliar os danos oxidativos provocados pela presença do metal, nomeadamente ao nível dos lípidos;
- Avaliar os mecanismos de resposta antioxidante ao stresse por cádmio.

7.2 Material e Métodos

7.2.1 Material biológico

Nesta tarefa foram utilizados 6 dos 8 isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* introduzidos nos solos contaminados. A escolha baseou-se uma vez mais na sua origem, na eficácia simbiótica relativa e na tolerância ao cádmio observada em meio artificial. Os isolados foram submetidos a concentrações crescentes de cádmio que provocaram percentagens de inibição do crescimento diferentes. De acordo com as percentagens de inibição registadas em duas concentrações (20 e 35 μM) os isolados foram classificados como sensíveis, moderadamente tolerantes e tolerantes (Tabela 7.1). As concentrações de cádmio escolhidas permitiram avaliar se os níveis de stresse oxidativo aumentam com a concentração de cádmio e de que forma o sistema antioxidante responde em isolados com diferentes tolerâncias.

Tabela 7.1 – Origem, eficácia simbiótica relativa (ESR) e percentagem de inibição do crescimento provocado pelo cádmio nos isolados de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* utilizados.

		Cádmio - Inibição crescimento (%)		Origem (solo)	ESR (%)
Isolados		20 μM	35 μM		
Sensíveis	C 1-2	80	90	Controlo (BC)	57
	A 14-2			Muito contaminado (BA)	-
Moderamente Tol.	C 3-1	75	80	Controlo (BC)	0
	D 2-2			Medianamente contaminado (BD)	35
Tolerantes	C 3-4	50	80	Controlo (BC)	0
	A 17-3			Muito contaminado (BA)	-

7.2.2 Preparação das amostras

Os isolados foram colocadas a crescer em meio ML suplementado com diferentes concentrações de CdCl_2 (0, 20 μM e 35 μM). As culturas foram incubadas com agitação (150 rpm) durante 72 h a 28 °C. As células foram recolhidas por centrifugação a 10000 g a 4 °C durante 10 min e os extractos celulares lavados 2 vezes com 1 ml de água destilada e centrifugados novamente. Os sedimentos foram recolhidos e congelados a -80 °C. Estes

serviram para a quantificação do conteúdo em peróxido de hidrogénio, determinação de danos oxidativos (peroxidação lipídica) e determinação da actividade de enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase), assim como para a determinação dos tióis totais.

7.2.3 Determinação de espécies reactivas de oxigénio (ROS)

7.2.3.1 Conteúdo em peróxido de hidrogénio (H_2O_2)

Os extractos celulares foram ressuspensos em 500 μl de 50 mM tampão fosfato de potássio pH 7,0 e homogeneizados com uma sonda de ultrasons em gelo em 2 ciclos de 15 seg (0,7 ciclos seg^{-1} ; 50% amplitude). A suspensão final foi centrifugada a 10000 g durante 15 min a 4 °C.

Para a determinação do conteúdo em H_2O_2 a 100 μl de extracto celular juntou-se 1 ml de 0,28 mM vermelho de fenol contendo 8,5 U ml^{-1} de peroxidase *horseradish*. As amostras foram incubadas com agitação (180 rpm) a 25 °C durante 10 min. A reacção foi terminada após a adição de 60 μl de 1 M NaOH. A absorvância foi lida a 610 nm e o conteúdo em H_2O_2 determinado usando como solução padrão H_2O_2 . A quantificação do conteúdo em H_2O_2 foi determinada de acordo com o método de Pick e Mizel (1981) modificado.

7.2.4 Determinação de danos celulares

7.2.4.1 Peroxidação Lipídica

Os extractos celulares foram ressuspensos em 500 μl de 50 mM tampão fosfato de potássio pH 7,0 e homogeneizados com uma sonda de ultrasons em gelo em 2 ciclos de 15 seg (0,7 ciclos seg^{-1} ; 50% amplitude). A cada extracto foram adicionados 56 μl de ácido tricloroacético (TCA) a 100% e posteriormente homogeneizados no vórtex durante 1 minuto. A suspensão final foi centrifugada a 10000g durante 15 min a 4 °C.

Para determinar o grau de peroxidação lipídica misturaram-se 150 μl de extracto celular, 100 μl de 100 mM EDTA e 450 μl de uma solução de 1% (m/v) ácido tiobarbitúrico (TBA), 0,05 M NaOH e 0,025% (m/v) BHT (2,6-di-tert-butyl-p-cresol). As amostras foram fervidas 40 min num banho e depois colocadas em gelo de modo a terminar a reacção. A

absorvância foi determinada a 532 nm e a concentração de peróxidos lipídicos foi expressa em $\mu\text{moles MDA mg proteína}^{-1}$ usando o coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7.2.5 Determinação da actividade das enzimas antioxidantes

Neste trabalho, a actividade da SOD e da CAT foram determinadas por dois métodos: método espectrofotométrico e o método de detecção em gel nativo de poliacrilamida.

7.2.5.1 Superóxido dismutase (SOD)

- Método espectrofotométrico

Os extractos celulares foram ressuspensos em 500 μl de 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e homogeneizados com uma sonda de ultrasons em gelo em 2 ciclos de 15 seg (0,7 ciclos seg^{-1} ; 50% amplitude). A suspensão final foi centrifugada a 10000 g durante 15 min a 4 °C.

A actividade da SOD foi determinada pelo método químico do nitroazul de tetrazólio (NBT). O ensaio foi baseado na capacidade da SOD inibir a redução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971). A mistura de reacção continha 100 μl de amostra, 425 μl de sal de tetrazólio a 57 μM e 50 μl de xantina oxidase a 56,1 mU ml^{-1} . As amostras foram incubadas 45 min à temperatura ambiente com agitação de 350 rpm. A fotorredução do NBT foi medida a 560 nm e a actividade da SOD foi determinada usando padrões conhecidos desta enzima. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a dismutação de 50% dos radicais de superóxido. A actividade da enzima foi expressa em $\text{U SOD mg proteína}^{-1}$.

- Actividade da SOD em gel nativo de poliacrilamida

Preparação das amostras

Os extractos celulares foram ressuspensos em 300 μl de 100 mM tampão fosfato de potássio pH 7, 1 mM EDTA e homogeneizados com uma sonda de ultrasons em gelo em 2 ciclos de 15 seg (0,7 ciclos seg^{-1} ; 50% amplitude). A suspensão final foi centrifugada a 10000 g durante 15 min a 4°C e o sobrenadante guardado a -80 °C para

posterior utilização. A quantidade de proteína presente em cada amostra foi quantificada usando o método de Bradford (Bradford, 1976).

As amostras foram preparadas em tampão da amostra (125 mM Tris-HCl pH 8,3, 80% (v/v) glicerol a 87% e 0,02% (m/v) azul de bromofenol) na proporção de 3:1 (amostra:tampão).

Electroforese

A detecção da actividade da SOD em gel foi realizada através da aplicação de 50 µg de proteína em géis nativos de poliacrilamida. Utilizou-se um gel de separação a 10% (40% acrilamida:bisacrilamida (37:1 Sigma), 375 mM Tris-HCl pH 8,85) e um gel de empacotamento a 4% (40% acrilamida:bisacrilamida (37:1 Sigma), 125 mM Tris-HCl pH 6,8). A polimerização dos géis foi iniciada com 0,1% TEMED e 0,1% (m/v) de persulfato de amónio. A electroforese foi efectuada a 4 °C com corrente constante de 40 mA (20 mA por cada gel) em tampão de corrida (192 mM glicina, 25 mM Tris-HCl).

Coloração

A coloração dos géis foi efectuada de acordo com o método de Beauchamp e Fridovich (1971). Os géis de poliacrilamida foram colocados numa solução de 2,45 mM de NBT durante 20 min. Em seguida, os géis foram colocados na solução reveladora (28 mM de TEMED, 86 µM de riboflavina em 30 mM de tampão fosfato potássio pH 7,8) durante 15 min. Para visualizar as diferentes isoformas adicionaram-se diferentes inibidores: 2 mM de KCN de modo a inibir a Cu/Zn-SOD e 8 mM de H₂O₂ para inibir a Cu/Zn-SOD e a Fe-SOD (Dunlap e Steinman, 1986). Colocaram-se os géis em água destilada procedeu-se à sua iluminação com uma lâmpada de 60 W.

7.2.5.2 Catalase (CAT)

- Método espectrofotométrico

Os extractos celulares foram ressuspensos em 500 µl de 100 mM tampão fosfato de potássio pH 7,0 contendo 1 mM EDTA e homogeneizados com uma sonda de

ultrasons em gelo em 2 ciclos de 15 seg (0,7 ciclos seg^{-1} ; 50% amplitude). A suspensão final foi centrifugada a 10000 g durante 15 min a 4°C.

A actividade da catalase foi determinada de acordo com Johansson e Borg (1988). O método é baseado na acção da enzima sobre o metanol na presença de uma concentração óptima de H_2O_2 . Para tal, preparou-se uma mistura com 200 μl de 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0, 75 μl de metanol e 100 μl de amostra. A reacção foi iniciada com a adição de 50 μl de 35,28 mM H_2O_2 e a mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 20 min. Após esse período adicionou-se 75 μl de 10 M KOH para terminar a reacção, e posteriormente 75 μl de 34,2 mM de Purpald. A mistura foi uma vez mais incubada nas condições anteriores durante 10 min, após o qual foi acrescentado 25 μl de 65,2 mM periodato de potássio. O preparado foi novamente incubado nas mesmas condições durante 5 min. A actividade da catalase foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm usando 4-amino-3-hidrazino-5-mercaptop-1,2,4-triazole (Purpald) como cromogénio (Johansson e Borg, 1988; Wheeler et al., 1990). A actividade da enzima foi expressa em μmol de formaldeído formado por mg de proteína.

- Actividade da CAT em gel nativo de poliacrilamida

Preparação das amostras

Os extractos celulares foram ressuspensos em 300 μl de 100 mM tampão fosfato de potássio pH 7, 1 mM EDTA e homogeneizados com uma sonda de ultrasons em gelo em 2 ciclos de 15 seg (0,7 ciclos seg^{-1} ; 50% amplitude). A suspensão final foi centrifugada a 10000 g durante 15 min a 4°C e o sobrenadante guardado a -80 °C para posterior utilização. A quantidade de proteína presente em cada amostra foi quantificada usando o método de Bradford (Bradford, 1976).

As amostras foram preparadas em tampão da amostra (125 mM Tris-HCl pH 8,3, 80% (v/v) glicerol a 87% e 0,02% (m/v) azul de bromofenol) na proporção de 3:1 (amostra:tampão).

Electroforese

A detecção da actividade da catalase em gel foi feita através da aplicação de 25 mg de proteína de cada amostra em géis nativos de poliacrilamida. Utilizou-se um gel de corrida a 7,5% (40% acrilamida:bisacrilamida (37:1 Sigma), 375 mM Tris-HCl pH 8,85) e um gel de empacotamento a 4% (40% acrilamida:bisacrilamida (37:1 Sigma), 125 mM Tris-HCl pH 6,8). A polimerização dos géis foi iniciada com 0,1% de TEMED e 0,1% de persulfato de amónio. A electroforese foi efectuada a 4 °C com corrente constante de 40 mA (20 mA por cada gel) em tampão de corrida (192 mM glicina, 25 mM Tris-HCl).

Coloração

A coloração dos géis foi realizada de acordo com o método descrito por Clare et al. (1984). Assim, os géis foram colocados numa solução de 50 µg ml⁻¹ de peroxidase *horseradish* em 50 mM tampão fosfato potássio pH 6,8 durante 45 min à temperatura ambiente e com agitação. Ao fim dos 45 min adicionou-se 30% de H₂O₂ numa concentração final de 5 mM e colocaram-se os géis novamente a agitar durante 10 min. Em seguida os géis foram lavados duas vezes com água destilada e por último colocados numa solução de 0,5 mg ml⁻¹ de DAB (3-3'-diamobenzidina).

7.2.5.3 Glutathione peroxidase (GPx)

Os extractos celulares foram ressuspensos em 500 µl de 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 5 mM EDTA, 1 mM DTT e homogeneizados com uma sonda de ultrasons em gelo em 2 ciclos de 15 seg (0,7 ciclos seg⁻¹; 50% amplitude). A suspensão final foi centrifugada a 10000 g durante 15 min a 4 °C.

A actividade da GPx foi determinada através de um ensaio indirecto (Paglia e Valentine, 1987). Na primeira reacção a GPx reduz o hidroperóxido de cumeno através da oxidação da GSH com formação de GSSG, na segunda reacção a GSSG é novamente reduzida a GSH pela GR com consumo de NADPH. À mistura de reacção contendo 150 µl de amostra, 219 µl de 50 mM tampão Tris-HCl pH 7,6; 5 mM de EDTA, 60 µl de 2 mM hidroperóxido de cumeno, 120 µl de 5 mM GSH e 6 µl de 25 U ml⁻¹ GR, adicionou-se 45 µl de 2 mM NADPH para dar início a reacção. A mistura foi cuidadosamente agitada durante

alguns segundos e o decréscimo de absorvância a 340 nm foi acompanhado durante 3 min. A actividade da enzima foi determinada usando o coeficiente de extinção molar de $0,00622 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ para o NADPH e a actividade da enzima foi expressa em U GPx mg proteína⁻¹.

7.2.6 Determinação de tióis totais

Os extractos celulares foram ressuspensos em 500 μl de 0,1 N HCl homogeneizados com uma sonda de ultrasons em gelo em 2 ciclos de 15 seg (0,7 ciclos seg⁻¹; 50% amplitude). A suspensão final foi centrifugada a 10000 g durante 15 min a 4 °C.

Para a determinação do conteúdo em tióis totais a 150 μl de extracto celular juntou-se 400 μl de 100 mM de tampão Tris-HCl pH 8 contendo 1 mM EDTA. Adicionou-se 50 μl de 10 mM DTNB dissolvido em 100 mM de tampão fosfato potássio pH 7,4. As amostras foram incubadas no escuro e à temperatura ambiente durante 30 min. A absorvância foi lida a 412 nm e o conteúdo em tióis totais determinado usando como solução padrão GSH. A quantificação do conteúdo em tióis totais foi determinada de acordo com Ellman (1959).

7.2.7 Quantificação da proteína total

O conteúdo em proteínas solúveis foi determinado de acordo com o método Bradford (1976) usando albumina do soro bovino (BSA) como padrão. O ensaio é baseado na formação do complexo albumina-corante, detectado espectrofotometricamente a 595 nm.

7.2.8 Análise estatística

As diferenças significativas entre as médias foram determinadas através da análise de variâncias - ANOVA unifactorial com aplicação do teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando o programa Sigma Stat 3.5.

7.3 Resultados

7.3.1 Espécies reactivas de oxigénio (ROS)

7.3.1.1 Conteúdo em H₂O₂

O conteúdo em H₂O₂ presente nos isolados expostos a concentrações crescentes de cádmio (0, 20 µM e 35 µM) está apresentado na Figura 7.2.

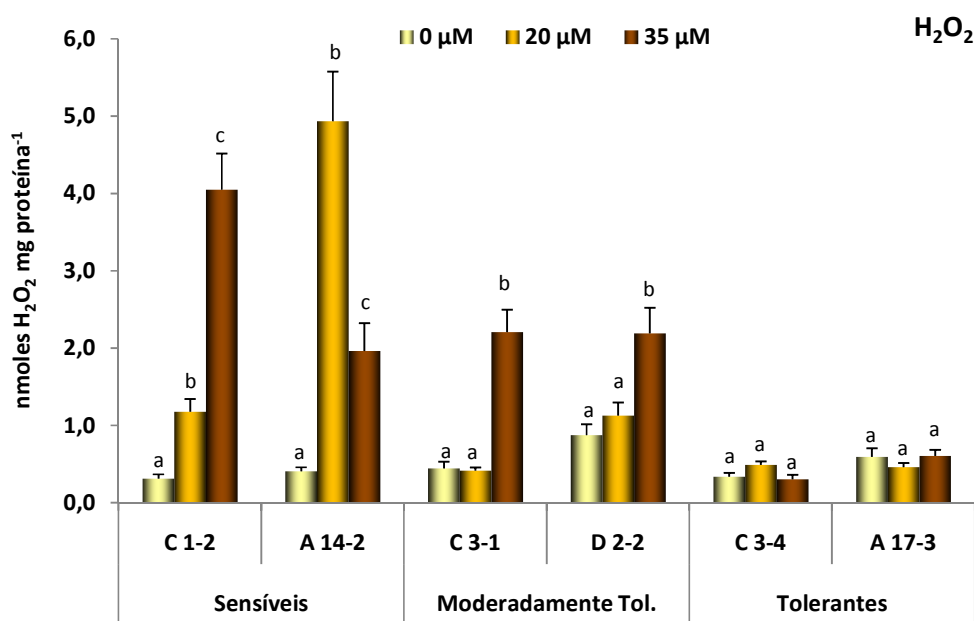


Figura 7.2 - Conteúdo de H₂O₂ (nmoles H₂O₂ mg proteína⁻¹) determinado nos diferentes isolados expostos a concentrações crescentes de cádmio (0, 20 e 35 µM). Os valores são médias (± erro padrão) de 10 a 16 réplicas. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias (P < 0,05).

O conteúdo em H₂O₂ variou significativamente entre as concentrações de cádmio testadas (P < 0,001) (Figura 7.2). Nos isolados sensíveis o conteúdo em H₂O₂ aumentou significativamente (P < 0,05) nas concentrações de 20 e 35 µM, contrariamente ao verificado nos isolados tolerantes onde o conteúdo em H₂O₂ foi igual na ausência e na presença de cádmio (P > 0,05). Nos isolados moderadamente tolerantes só se observou um aumento significativo (P < 0,05) do conteúdo em H₂O₂ na concentração de 35 µM.

7.3.2 Danos celulares

7.3.2.1 Peroxidação lipídica

Os níveis de peroxidação lipídica determinados nos diferentes isolados na presença e ausência de cádmio estão apresentados na Figura 7.3.

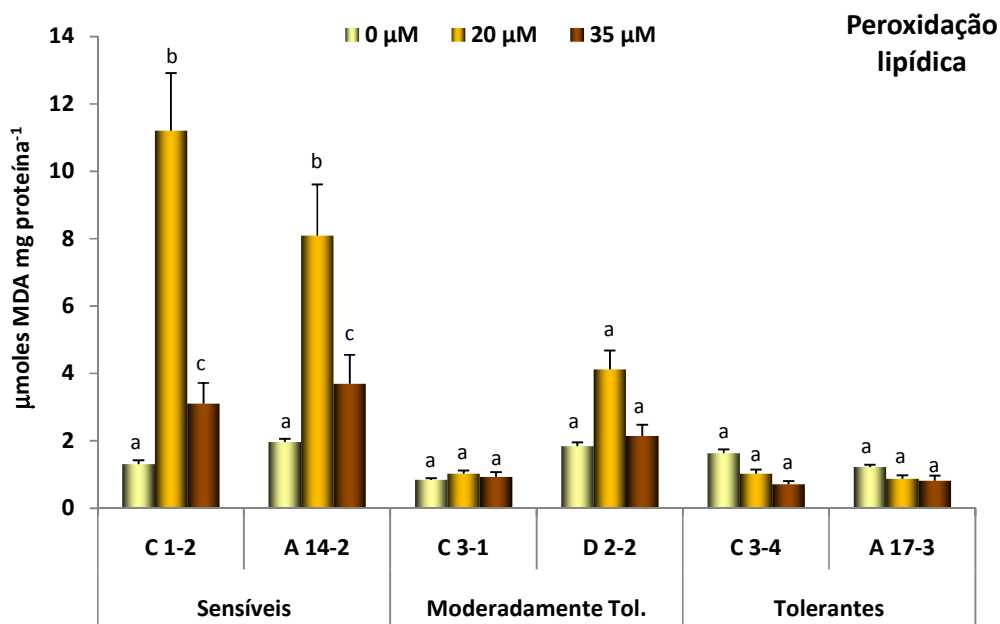


Figura 7.3 – Níveis de peroxidação lipídica ($\mu\text{mol MDA mg proteína}^{-1}$) determinados nos diferentes isolados expostos a concentrações crescentes de cádmio (0, 20 e 35 μM). Os valores são médias (\pm erro padrão) de 10 a 25 réplicas. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$).

Os níveis de peroxidação lipídica nos isolados sensíveis foram significativamente mais elevados na presença de cádmio ($P < 0,05$), sobretudo na concentração de 20 μM . Nos isolados moderadamente tolerantes e tolerantes não se observaram diferenças significativas nos lípidos oxidados na ausência e presença de cádmio ($P > 0,05$).

7.3.3 Enzimas antioxidantes

7.3.3.1 Actividade da superóxido dismutase (SOD)

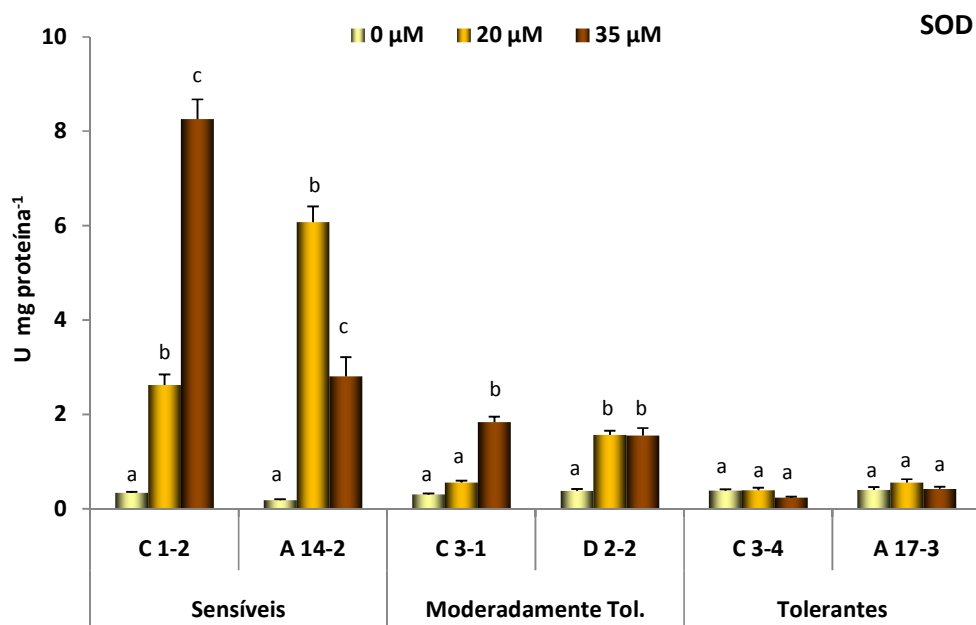


Figura 7.4 – Actividade da SOD ($\text{U mg proteína}^{-1}$) nos diferentes isolados expostos a concentrações crescentes de cádmio (0, 20 e 35 μM). Os valores são médias (\pm erro padrão) de 12 a 20 réplicas. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$).

Na Figura 7.4 podemos observar a actividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nos isolados expostos a concentrações crescentes de cádmio (0, 20 e 35 μM). Nos isolados sensíveis a actividade desta enzima foi significativamente superior na presença de metal ($P < 0,05$), tendo-se verificado o mesmo nos isolados moderadamente tolerantes. Nos isolados tolerantes não foram observadas diferenças significativas na actividade da SOD entre as diferentes concentrações testadas ($P > 0,05$).

7.3.3.2 Actividade catalase (CAT)

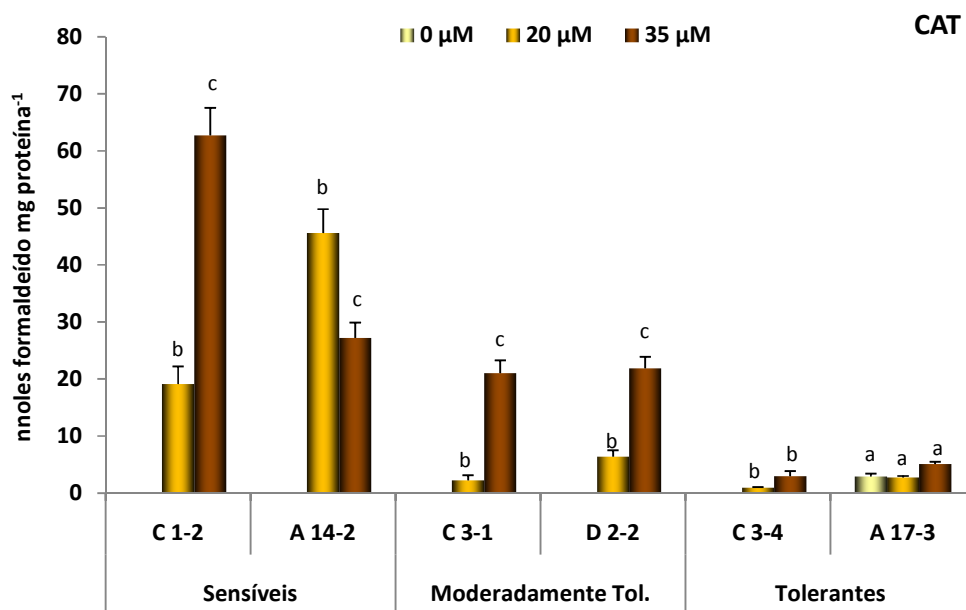


Figura 7.5 – Actividade da CAT (nmoles formaldeído mg proteína⁻¹) nos diferentes isolados expostos a concentrações crescentes de cádmio (0, 20 e 35 μM). Os valores são médias (± erro padrão) de 9 a 18 réplicas. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias (P < 0,05).

A actividade da catalase registada nos isolados expostos às diferentes concentrações de cádmio (0, 20 e 35 μM) está apresentada na Figura 7.5. Na maioria dos isolados não foram determinados valores de actividade de CAT na ausência de cádmio. Este resultado poderá estar relacionado com o facto do método utilizado não ser suficientemente sensível para detectar níveis muito baixos desta enzima. Os isolados sensíveis observou-se um aumento significativo (P < 0,05) da actividade da CAT na concentração de 20 e 35 μM, tendo-se observado o mesmo para os isolados moderadamente tolerantes, especialmente na presença de 35 μM de cádmio. Nos isolados tolerantes a actividade da CAT não se alterou na presença de concentrações mais elevadas de cádmio (35 μM).

7.3.3.3 Actividade da glutatona peroxidase (GPx)

A actividade da GPx registada nos diferentes isolados na ausência e na presença de cádmio (20 e 35 μM) está apresentada na Figura 7.6. Na ausência do ião metálico a actividade da GPx foi semelhante entre os diferentes isolados ($P > 0,05$). Os isolados tolerantes não mostraram diferenças significativas com ou sem exposição ao metal. No entanto, nos isolados sensíveis e moderadamente tolerantes a actividade da GPx foi significativamente superior nas concentrações de 20 e 35 μM de cádmio em comparação com a actividade desta enzima na ausência de metal.

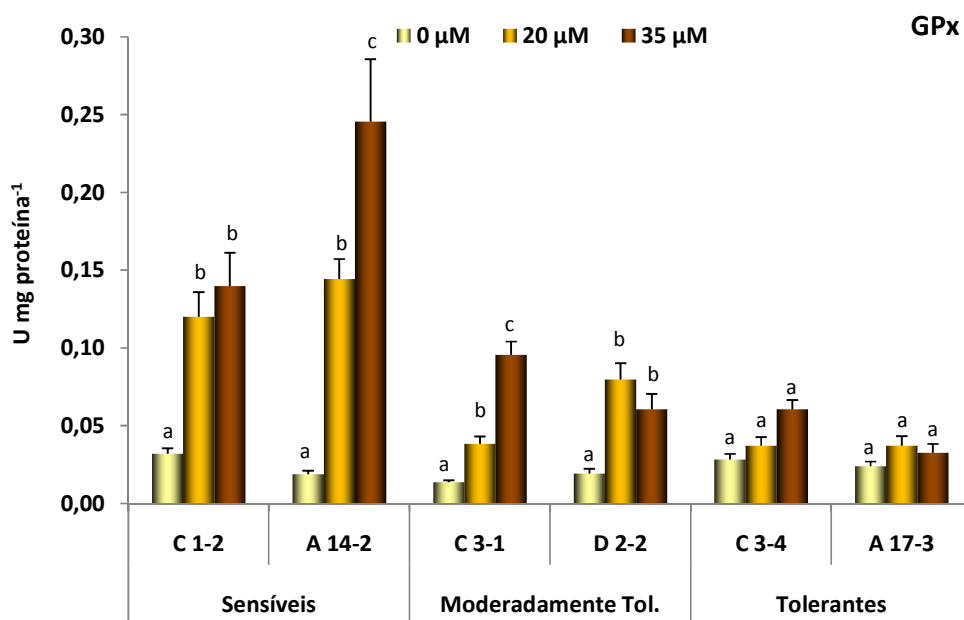


Figura 7.6 – Actividade da GPx ($\text{U mg proteína}^{-1}$) nos diferentes isolados expostos a concentrações crescentes de cádmio (0, 20 e 35 μM). Os valores são médias (\pm erro padrão) de 9 a 17 réplicas. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$).

7.3.4 Conteúdo em tióis totais

O conteúdo em tióis totais foi determinado nos isolados que cresceram em meio ML suplementado com concentrações crescentes de cádmio (Figura 7.7). Apenas o isolado A 14-2 mostrou um aumento significativo ($P < 0,05$) no conteúdo em tióis à medida que a exposição ao cádmio aumentou. Para os restantes isolados não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre o conteúdo de tióis na concentração zero e o conteúdo de tióis nas concentrações de 20 e 35 μM .

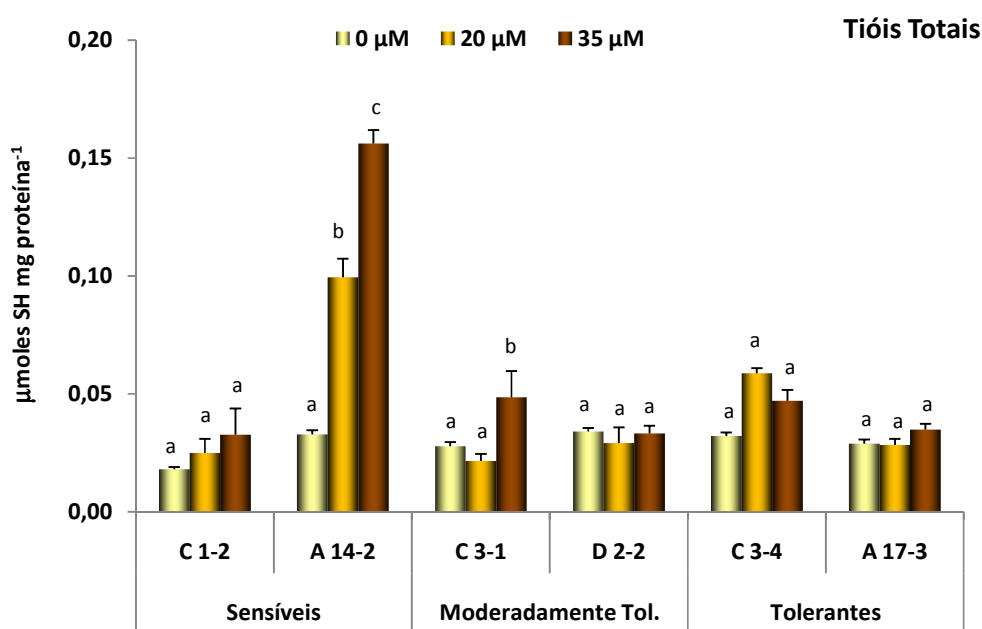


Figura 7.7 – Conteúdo em tióis totais ($\mu\text{moles SH mg proteína}^{-1}$) nos diferentes isolados expostos a concentrações crescentes de cádmio (0, 20 e 35 μM). Os valores são médias (\pm erro padrão) de 10 a 18 réplicas. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$).

7.3.5 Comparação dos níveis de stress oxidativo dos isolados com 80% de inibição do crescimento

Os isolados de rizóbio mostraram diferenças significativas do crescimento na presença do cádmio. Consoante a percentagem de inibição do crescimento (face ao zero) determinada para cada isolado, estes foram classificados em sensíveis, moderadamente tolerantes e tolerantes. Contudo, para podermos fazer uma análise comparativa entre

isolados é importante que o nível de stresse imposto seja idêntico. Assim, nas Figuras 7.8 e 7.9 podemos observar o conteúdo em H_2O_2 , os danos celulares e a actividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) para os diferentes isolados com 80% de inibição do crescimento. Os isolados sensíveis apresentaram níveis mais altos de stresse oxidativo, o que pode ser comprovado pelo conteúdo mais elevado em H_2O_2 e os níveis maiores de peroxidação lipídica. Embora o conteúdo em ROS também tenha sido relativamente elevado nos isolados moderadamente tolerantes, o aumento das enzimas antioxidantes permitiu combater este excesso não se tendo observado danos ao nível dos lípidos. O stresse oxidativo nos isolados tolerantes foi praticamente inexistente.

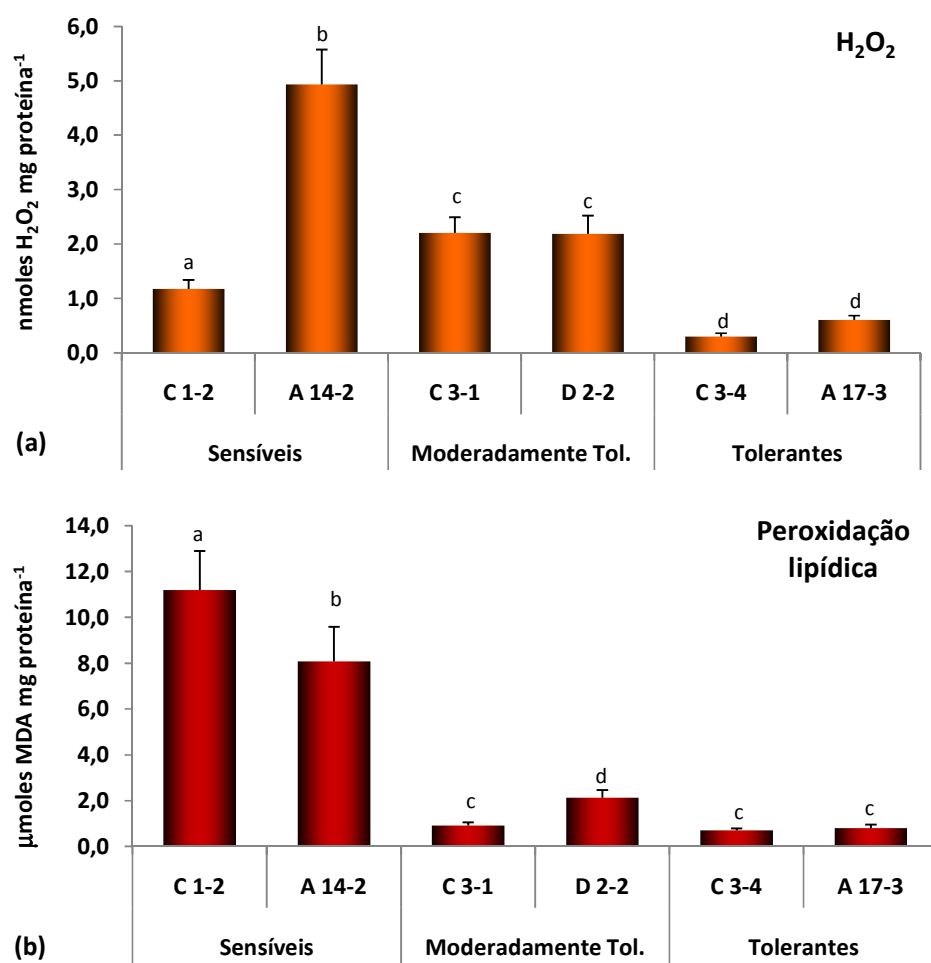


Figura 7.8 – Conteúdo de H_2O_2 (nmoles H_2O_2 mg proteína⁻¹) (a) e níveis de peroxidação lipídica (μmol MDA mg proteína⁻¹) (b) determinados nos diferentes isolados crescidos na presença de concentrações de cádmio que provocaram 80% de inibição do crescimento. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$).

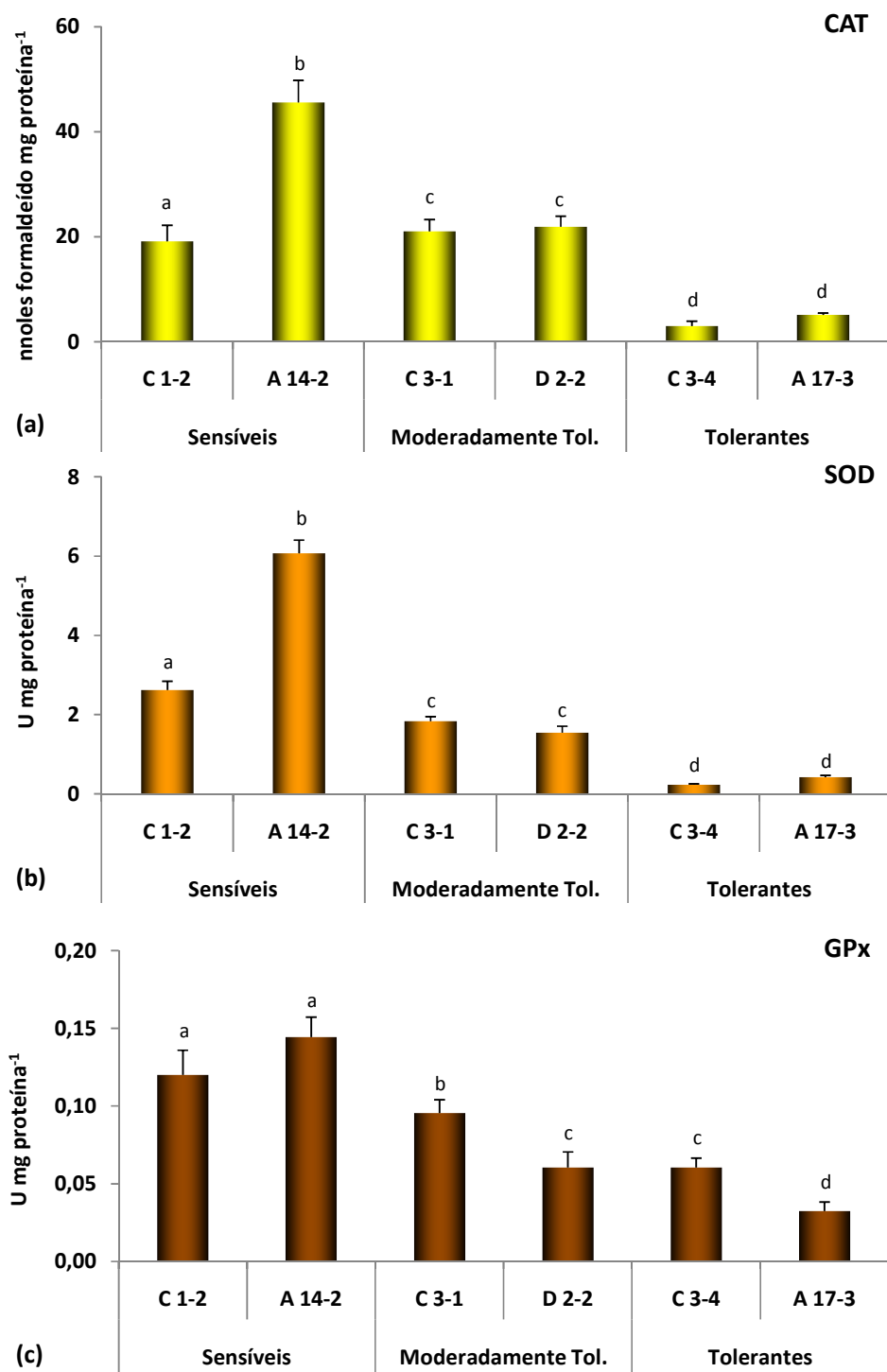


Figura 7.9 – Actividade das enzimas SOD (a) (U mg proteína⁻¹), CAT (b) (nmoles formaldeído mg proteína⁻¹) e GPx (c) (U mg proteína⁻¹) determinadas nos diferentes isolados crescidos na presença de concentrações de cádmio que provocaram 80% de inibição do crescimento. Para cada isolado letras diferentes são indicativas de diferenças significativas entre as médias ($P < 0,05$).

7.3.6 Actividade da SOD e CAT em géis nativos

Na Figura 7.10 estão apresentados os géis nativos corados para a actividade da SOD total. Pela análise dos géis foi possível verificar a existência de uma isoforma comum a todos os isolados. Esta isoforma corresponde à Mn-SOD (a) uma vez que a zona acromática foi mantida na presença dos inibidores KCN e H₂O₂. No isolado A 14-2 e D 2-2 foi encontrada além da isoforma Mn-SOD (a) a isoforma Fe-SOD (b) em todas as concentrações de cádmio testadas.

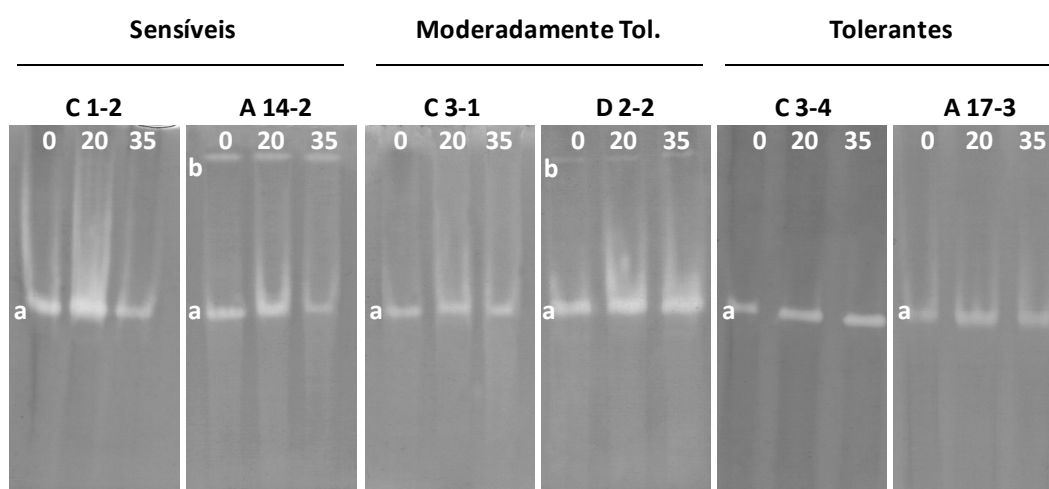


Figura 7.10 – Géis nativos de poliacrilamida corados para a actividade da SOD total em extractos celulares de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* expostos a 0, 20 e 35 µM de cádmio. a – Mn-SOD; b – Fe-SOD.

Na Figura 7.11 podemos observar os géis nativos de poliacrilamida corados para a actividade da CAT. No total foram encontradas 5 isoformas diferentes da CAT que estão assinaladas na Figura 7.11 com as letras *a*, *b*, *c*, *d* e *e*. As isoformas variaram entre isolados e a sua actividade variou com a exposição ao metal. No caso do isolado sensível C 1-2, na ausência de metal observaram-se 3 isoformas (*a*, *b* e *c*). A actividade das isoformas *a* e *b* diminuiu na presença de cádmio enquanto que a actividade da isoforma *c* aumentou. No isolado A 14-2, além da isoforma *c* observaram-se 2 novas isoformas (*d* e *e*). A actividade das isoformas *c* e *d* aumentou na presença do cádmio, enquanto que a actividade da isoforma *e* foi inibida em ambas as concentrações (20 e 35 µM). Os isolados medianamente tolerantes têm em comum as isoformas *c* e *d*, embora com actividades

diferentes na presença de metal. No isolado C 3-1 a actividade de ambas as isoformas (*c* e *d*) foram inibidas nas concentrações de 20 e 35 μM de cádmio, enquanto no isolado D 2-2 a actividade da isoforma *d* foi inibida apenas na presença de 35 μM de metal. Nos isolados tolerantes (C 3-4 e A 17-3) foram encontradas as isoformas *a* e *b* com actividades muito semelhantes na ausência e na presença de cádmio.

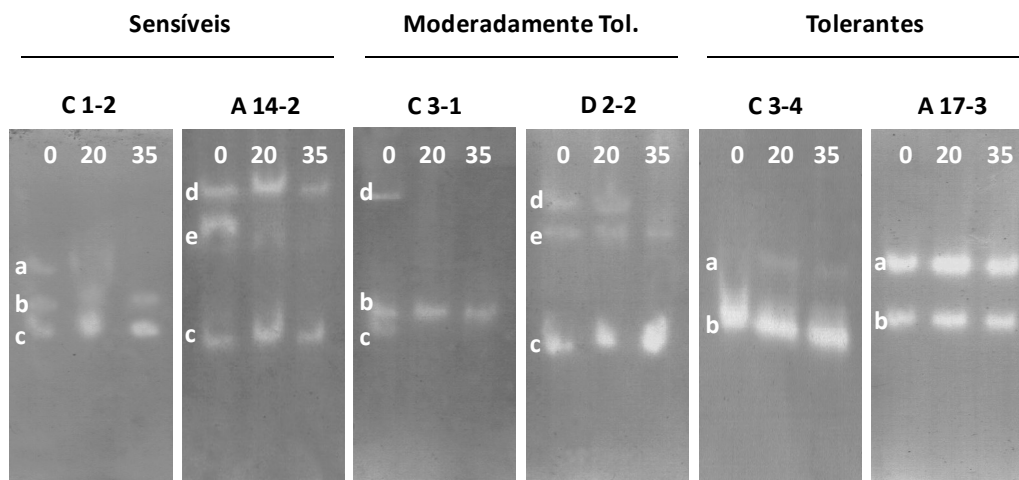


Figura 7.11 – Géis nativos de poliacrilamida corados para a actividade da catalase em extractos celulares de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* expostos a 0, 20 e 35 μM de cádmio. As letras *a*, *b*, *c*, *d* e *e* foram utilizadas para distinguir as diferentes isoformas.

7.4 Discussão

Vários estudos sugerem que a toxicidade induzida pelos metais nas bactérias possa ser uma consequência dos danos oxidativos resultantes do excesso de ROS. Por outro lado, alguns autores referem que a capacidade antioxidante das células está relacionada com o aumento da tolerância a diferentes tipos de stresse (Corticeiro et al., 2006). Alguns metais, nomeadamente o ferro e o cobre, possuem a capacidade de induzir danos oxidativos devido ao seu poder de auto-oxidação associado às reacções de Fenton. O cádmio não é um metal redox activo mas existem vários estudos que mostraram a indução de stresse oxidativo em bactérias após exposição a Cd (Clark e Kunkel, 2004; Pacheco et al., 2008; Pathak e Khandelwal, 2006). Uma vez formados, os ROS devem ser imediatamente eliminados para minimizar os danos celulares. Desta forma, os principais mecanismos de desintoxicação de ROS constituem a chamada “segunda linha de defesa” antioxidante (Moller, 2001).

7.4.1 Stresse oxidativo provocado pelo cádmio

Nos isolados sensíveis observou-se um aumento significativo do conteúdo em H_2O_2 na presença de 20 e 35 μM de cádmio no meio de crescimento (Figura 7.2). Resultados similares foram obtidos por Pacheco et al. (2008) que também verificaram um aumento de ROS em *E. coli* na presença de Cd. Neste estudo, o conteúdo em O_2^- não foi determinado nas células expostas ao cádmio, contudo alguns autores referem o aumento do radical superóxido em condições de stresse metálico (Ercal et al., 2001; Zhou et al., 2008). Além do efeito do cádmio, o aumento de H_2O_2 nas células também poderá estar relacionado com a dismutação do radical superóxido pela SOD. A actividade desta enzima nos dois isolados sensíveis aumentou significativamente ($P < 0,05$) na presença de metal (Figura 7.4), sugerindo a existência de elevadas quantidades do O_2^- na célula. O aumento de H_2O_2 na presença de cádmio, nos isolados sensíveis, foi acompanhado pelo aumento da actividade da CAT e da GPx (Figuras 7.5 e 7.6). Estas enzimas têm como função eliminar o peróxido de hidrogénio através da sua conversão em água. Estes resultados sugerem que a eliminação do O_2^- e do H_2O_2 requer a acção em sincronia de enzimas como

a CAT, a GPx e a SOD. Contrariamente ao verificado por Ercal et al. (2001) o cádmio não inibiu a actividade das diversas enzimas antioxidantes analisadas neste estudo. O stresse oxidativo está dependente de um balanço geral entre a produção de ROS e a resposta do sistema antioxidante das células (Noctor e Foyer, 1998; Gratão et al., 2005). Nos isolados sensíveis observou-se um aumento dos níveis de peroxidação lipídica na presença de cádmio (Figura 7.3), sugerindo que o aumento da actividade das diferentes enzimas antioxidantes não foi suficiente para evitar os danos celulares ao nível dos lípidos e consequentemente o stresse oxidativo.

Nos isolados moderadamente tolerantes observou-se que apenas na concentração mais elevada de cádmio (35 μ M) os níveis de H_2O_2 foram significativamente ($P < 0,05$) aumentados (Figura 7.2). No entanto, não foram observados danos oxidativos nos lípidos provavelmente devido à acção das enzimas antioxidantes cuja actividade foi aumentada na presença de metal (Figuras 7.4, 7.5 e 7.6).

Nos isolados tolerantes o cádmio não induziu stresse oxidativo, já que a produção de ROS não aumentou e não se registou peroxidação dos lípidos (Figuras 7.2 e 7.3). A ausência de stresse oxidativo nestes isolados não está relacionada com a resposta das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx), uma vez que as suas actividades não aumentaram na presença de metal (Figuras 7.4, 7.5 e 7.6). Estes resultados apontam para a existência de mecanismos que limitam os efeitos nefastos do metal nos processos metabólicos evitando a produção excessiva de ROS. Vários autores (Figueira et al., 2005; Pereira et al., 2006b; Purchase et al., 1997) mostraram que isolados de *Rhizobium* tolerantes tendem a acumular concentrações mais elevadas de cádmio no citoplasma do que os isolados sensíveis. Contudo, os isolados tolerantes possuem mecanismos que minimizam os efeitos dos metais, justificando os níveis baixos de stresse oxidativo encontrados nestes nos isolados (C 3-4 e A 17-3). Entre os mecanismos salientam-se a ligação a polissacarídeos intracelulares, ácidos orgânicos (Purchase et al., 1997) e glutathiona (Lima et al., 2006) assim como o transporte do metal do citoplasma para o espaço periplasmático (Prévéral et al., 2009).

Os resultados obtidos mostraram que o cádmio induziu níveis de stresse oxidativo mais elevados nos isolados sensíveis do que nos isolados moderadamente tolerantes e

tolerantes. Tal facto pode ser confirmado pelas quantidades elevadas de H_2O_2 e danos oxidativos existentes nos isolados sensíveis comparativamente aos verificados nos isolados mais tolerantes (Figura 7.8). Níveis menores de stresse oxidativo nas estirpes tolerantes também foram observados por Corticeiro et al. (2006). Estes autores consideraram que GSH teve um papel primordial na tolerância dos isolados, assim como na diminuição do stresse oxidativo imposto pelo cádmio. Vários autores apontam os tióis como antioxidantes muito importantes no combate das bactérias ao stresse oxidativo (Kim et al., 1998; Li et al., 1997; Youn et al., 1996). Neste estudo, foi determinado o conteúdo em tióis totais na ausência e presença de cádmio (Figura 7.7). Contudo, com excepção do isolado A 14-2 não foram observadas diferenças significativas no conteúdo em tióis na presença de metal ($P > 0,05$). Neste isolado observou-se um aumento de tióis totais nas concentrações de 20 e de 35 μM de cádmio. No entanto, o aumento dos tióis não foi suficiente para evitar os danos oxidativos nos lípidos e consequentemente o stresse oxidativo. Deste modo, podemos concluir que os tióis totais não foram essenciais no combate ao stresse oxidativo provocado pelo cádmio.

7.4.2 Actividade da SOD e CAT em géis nativos

A actividade da SOD em géis nativos em *Rhizobium* tem sido vastamente estudada, contudo existe alguma controvérsia em relação às isoformas existentes nestas bactérias. Segundo Stowers e Elkan (1981) as bactérias de rizóbio em vida livre possuem apenas a isoforma Fe-SOD, contrariamente ao observado por Becana e Salin (1989) que encontram a Mn-SOD. A actividade da SOD total em géis nativos determinada nos isolados para as diferentes concentrações de cádmio testadas encontra-se representada na Figura 7.10. Podemos constatar a existência de uma isoforma comum a todos os isolados que corresponde à Mn-SOD uma vez que manteve a zona acromática na presença dos inibidores KCN e H_2O_2 . No entanto, os isolados A 14-2 e D 2-2 além da isoforma Mn-SOD também possuem a isoforma Fe-SOD. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Dimitrijevic et al. (1984) que detectaram a presença de ambas as isoformas em *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Por outro lado, a presença de cádmio não inibiu a actividade de nenhuma isoforma da SOD (Figura 7.10).

Quanto à actividade da CAT em géis nativos observou-se a existência de 5 isoformas diferentes (Figura 7.11 *a, b, c, d* e *e*), embora cada isolado possua no máximo 3 isoformas. Hérouart et al. (1996) e Sigaud et al. (1999) também detectaram a existência de 3 isoformas em *S. meliloti*. Contrariamente ao analisado para a actividade da SOD, a actividade das diferentes isoformas da CAT foi alterada na presença de metal, sobretudo nos isolados sensíveis e moderadamente tolerantes. De acordo com os resultados obtidos nestes isolados observou-se a inibição de algumas isoformas na presença de cádmio (*a, d*, e *e*). Pelo contrário, nos isolados tolerantes foram detectadas duas isoformas em todas as concentrações de cádmio testadas com actividades semelhantes.

Capítulo 8

Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras

As actividades industriais e agrícolas promovem a libertação de grandes quantidades de metais pesados para o meio ambiente, cujos níveis nos solos constituem um risco latente para o Homem e para a saúde dos ecossistemas. Deste modo, o trabalho desenvolvido ao longo desta tese teve como principais objectivos: (1) avaliar o impacto da extracção mineira na qualidade dos solos através da quantificação da actividade de algumas enzimas do solo; (2) determinar a dimensão das populações de rizóbio indígenas dos solos da mina do Braçal; (3) isolar populações de rizóbio e determinar a capacidade simbiótica das estirpes que nodulam o trevo branco; (4) avaliar a diversidade das populações de rizóbio; (5) determinar a tolerância dos isolados de rizóbio em meio artificial suplementado com diferentes concentrações de metais pesados; (6) avaliar a sobrevivência ao longo do tempo de alguns isolados de rizóbio através da introdução das estirpes nos solos irradiados em estudo e por fim (7) avaliar a resposta do rizóbio ao stresse oxidativo provocado por cádmio.

Os resultados obtidos nesta tese permitiram obter informações importantes sobre o efeito dos metais nas populações rizobianas, quer ao nível da sobrevivência e permanência no solo, quer ao nível da fixação de azoto e diversidade. Deste modo, salientam-se os seguintes resultados:

- ✓ A actividade mineira desenvolvida durante mais de 100 anos na Mina do Braçal provocou a contaminação dos solos adjacentes com vários metais pesados. Nos solos BD e BA foram determinadas concentrações totais de metais pesados muito elevadas. Nestes

solos os limites impostos pelo Decreto de Lei nº 118 de 21 de Junho de 2006 foram largamente ultrapassados para a maioria dos metais, com especial ênfase para o Pb e Cd. As concentrações de arsénio nestes solos também estão acima dos níveis médios encontrados em solos não contaminados;

✓ A laboração da mina do Braçal parecer ter condicionado as propriedades físico-químicas dos solos adjacentes, uma vez que o pH registado em todos os solos foi muito ácido (<5,2) e o conteúdo em matéria orgânica baixo. Estes dois parâmetros podem provocar stresse adicional aos microrganismos do solo, uma vez que potenciam a biodisponibilidade dos metais pesados. Por outro lado, o pH ácido pode interferir directamente com a sobrevivência do rizóbio;

✓ As concentrações de metais pesados correlacionaram-se fortemente com a actividade da maioria das enzimas do solo analisadas. A actividade da desidrogenase e da catalase permitiu-nos estimar a actividade microbiana geral dos solos em estudo. Nos solos mais contaminados (BD e BA) a actividade de ambas foi significativamente reduzida quando em comparação com as actividades determinadas no solo controlo (BC). Este resultado sugere uma forte influência dos metais na actividade destas duas enzimas, evidenciando o seu potencial como indicadores de contaminação com metais pesados.

✓ Através da técnica do NMP determinou-se o número de rizóbios presentes no solo controlo (BC) e nos solos mais contaminados (BD e BA). A dimensão da população indígena de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do solo BC foi de $4,24 \times 10^4$ bactérias g^{-1} de solo. No solo BD e BA a dimensão das populações foi de 9,1 bactérias g^{-1} de solo e 7,3 bactérias g^{-1} de solo, respectivamente. O número reduzido de rizóbios nos solos contaminados está relacionado principalmente com as elevadas concentrações de metais pesados existentes nos solos, embora o pH ácido também poderá estar a influenciar estes resultados. Outra justificação será a presença da planta hospedeira no solo BC contrariamente ao verificado nos solos contaminados, uma vez que a planta hospedeira confere protecção à população rizobiana levando ao aumento do número de rizóbios nos solos;

✓ A autenticidade dos isolados foi confirmada com um teste de nodulação e através da análise do gene *nodC*. Os isolados C e D nodularam o trevo branco e possuem o gene *nodC*. Por outro lado, os isolados A perderam a capacidade de nodular e não possuem o gene *nodC*;

✓ A sequenciação do gene 16S rDNA de alguns isolados A permitiu concluir que o isolado A 18-4 tem uma similaridade muito reduzida com o organismo de referência *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. No entanto, a percentagem de homologia com o organismo de referência *Burkholderia xenovorans* LB 400 foi de 99%. Este resultado coloca-nos perante a possibilidade dos nódulos serem ocupados por outras bactérias do solo, como é o caso da *Burkholderia*;

✓ Os nódulos das plantas de trevo que cresceram no solo controlo apresentaram cor rosa e tamanho superior a 3 mm, enquanto a maioria dos nódulos dos solos contaminados eram brancos e de tamanho reduzido. Estes resultados indiciam a maior eficácia dos isolados da população do solo BC face aos isolados dos solos contaminados. Este facto foi comprovado pelos resultados obtidos com a determinação do peso seco das partes aéreas das plantas de trevo inoculadas com os isolados de cada local. Os isolados C 1-2, C 1-4, C 2-1 e C 3-2 foram considerados eficazes uma vez que o índice ESR foi superior a 17%. No solo BD apenas o isolado D 2-2 mostrou capacidade de fixar azoto, apresentando um índice ESR de 35%;

✓ Os isolados de rizóbio possuem capacidade de produzir substâncias promotoras do crescimento vegetal, nomeadamente ácido indol acético e sideróforos. Os isolados D e A mostraram menor capacidade em produzir IAA, com excepção do isolado D 2-1. A maioria dos isolados testados (94%) mostrou capacidade de produzir sideróforos. A solubilização do fosfato inorgânico foi verificada em apenas 4 isolados (C 3-4, C 5-4, A 8-1 e A 18-1);

✓ No conjunto dos 35 isolados analisados foram identificados 11 plasmídeos com pesos moleculares entre 669 kb e 56 kb. Nos isolados C foi encontrado maior número de

plasmídeos que variou entre 1 e 9. Contrariamente aos isolados originários dos locais contaminados que apresentaram menor número de plasmídeos. Nos isolados D encontraram-se entre 0 e 3 plasmídeos e na maioria dos isolados A não se registou a presença de plasmídeos com a excepção dos isolados A 17-3 e A 21-3 que possuem 2 plasmídeos cada. Embora a incidência de plasmídeos tenha sido superior nos isolados do solo BC verificou-se maior diversidade plasmídica na população isolada do solo BD;

✓ Os perfis de REP e ERIC-PCR confirmaram os resultados obtidos com a análise dos perfis plasmídicos, ou seja uma maior diversidade nas populações dos solos contaminados BD e BA. No entanto, as três populações estudadas apresentaram uma semelhança de 75% entre si;

✓ A análise dos perfis de proteínas totais permitiu confirmar os resultados obtidos anteriormente, uma vez que se verificou maior diversidade nas populações dos solos contaminados. Contudo, o poder de discriminação deste método é menor quando em comparação com métodos genéticos (REP e ERIC-PCR);

✓ Os perfis de LPS foram bastante distintos entre os isolados analisados e contrariamente ao observado com os restantes métodos observou-se maior diversidade nos isolados do solo controlo;

✓ Os diferentes métodos utilizados para avaliar a diversidade das populações de rizóbio permitiram concluir a existência de diferentes estirpes dentro do mesmo nódulo;

✓ O grau de tolerância dos isolados esteve dependente do metal e do local de origem. Os isolados D mostraram maior tolerância à maioria dos metais testados do que os isolados C. Ao contrário do esperado, os isolados do local muito contaminado (BA) foram menos tolerantes à maioria dos metais pesados e ao metalóide As. A menor tolerância destes isolados poderá estar relacionada com a ausência de plasmídeos nestas estirpes, uma vez que os genes de resistência a metais pesados estão muitas vezes localizados nos plasmídeos. No entanto, os isolados A foram muito tolerantes ao chumbo e a diversidade de tolerâncias foi elevada. O chumbo foi o único metal para o qual a

população A mostrou estar bem adaptada. Este resultado sugere que as concentrações de Pb extremamente elevadas e muito acima dos limites impostos por lei presentes no solo BA, exerceram uma grande pressão nos isolados de rizóbio, o que os levou a desenvolver mecanismos de tolerância a este metal de forma a conseguirem sobreviver. No entanto, uma vez que a maioria dos isolados A não possui plasmídeos, a sua tolerância ao Pb poderá estar associada a genes de resistência presentes no cromossoma ou a outro tipo de mecanismos não relacionados com sistemas de efluxo, como a precipitação intracelular do metal;

✓ A introdução dos isolados nos solos irradiados permitiu avaliar a sobrevivência destas estirpes ao longo de 12 meses. Constatou-se uma redução do número de rizóbios após 3 meses independentemente do solo. Contudo, verificou-se que os isolados introduzidos no solo BC conseguiram recuperar o tamanho das suas populações para números similares aos inicialmente introduzidos. No solo BD o número de rizóbios decresceu sempre ao longo dos 12 meses. As condições adversas do solo BA apenas permitiram a sobrevivência de 4 isolados até aos 3 meses e apenas dois deles conseguiram sobreviver após 12 meses. Estes isolados (C 3-1 e A 17-3) têm a particularidade de possuir um plasmídeo comum (669 kb), o que poderá estar na base da sobrevivência destas estirpes;

✓ Observou-se um aumento significativo do conteúdo em H_2O_2 nas células dos isolados sensíveis na presença de 20 e 35 μM de cádmio no meio de crescimento. Embora as actividades das enzimas antioxidantes também tenham sido induzidas na presença de cádmio, estas não foram suficientes para evitar os danos oxidativos provocados pelos ROS. Nos isolados moderadamente tolerantes não foram observados danos oxidativos nos lípidos provavelmente devido à acção das enzimas antioxidantes cuja actividade foi aumentada na presença de metal;

✓ Os níveis de stresse oxidativo provocado pelo cádmio foram superiores nos isolados sensíveis e praticamente inexistentes nos isolados tolerantes. Estes resultados sugerem a existência de mecanismos de adaptação/tolerância ao stresse metálico nos

isolados mais tolerantes, como a ligação dos metais a polissacarídeos intracelulares e a ácidos orgânicos assim como o transporte do metal do citoplasma para o espaço periplasmático.

O trabalho desenvolvido nesta tese permitiu avaliar o efeito nefasto dos metais nos solos e nas populações rizobianas. No entanto, algumas questões ficaram por responder podendo abrir novas perspectivas para trabalhos futuros.

- A perda de capacidade de nodular o trevo dos isolados A foi um resultado inesperado, assim como a ausência de plasmídeos. Por outro lado, o resultado obtido com a sequenciação parcial do gene 16S rDNA do isolado A 18-4 deixou uma porta aberta para a possibilidade de existirem outras bactérias que não rizóbio dentro do nódulo. Tendo em conta que ainda existem poucos trabalhos que possam confirmar este resultado, considero que seria muito importante estudar esta população de modo mais aprofundado e verificar a possibilidade de fixadores livres invadirem o nódulo conjuntamente com estirpes de rizóbio;

- Devido à contaminação generalizada dos solos com metais pesados têm-se incrementado o desenvolvimento de tecnologias para facilitar a sua remoção e consequente descontaminação dos solos. No trabalho desenvolvido nesta tese foi possível isolar estirpes eficazes de solos contaminados, como foi o caso do isolado D 2-2. Assim, num trabalho futuro seria interessante explorar o potencial de fitorremediação do sistema rizóbio-leguminosa. Por outro lado, a aplicação do sistema rizóbio-leguminosa em solos muito contaminados poderia contribuir para a revitalização dos mesmos elevando o número de efectivos, de modo a que os solos mais contaminados não se tornem praticamente estéreis. A influência que a introdução deste sistema (rizóbio-leguminosa) na manutenção de outros grupos de microrganismos também seria um factor importante a considerar;

- O rizóbio além de promover o crescimento das plantas através da fixação de azoto também promove o crescimento vegetal através da produção de substâncias como o ácido indol acético e sideróforos. Alguns trabalhos apontam para a possibilidades das bactérias que produzem estas substâncias ajudarem as plantas a tolerar concentrações mais elevadas de metais pesados. Assim, penso que também seria interessante utilizar estirpes de rizóbio bem adaptadas aos metais e com capacidade de produzir IAA e sideróforos em sistemas de fitorremediação com plantas não leguminosas.

- As bactérias que sobrevivem em ambientes extremamente contaminados com metais possuem propriedades intrínsecas ou mecanismos de tolerância indutíveis que lhes permite combater o stresse provocado pelos metais. Nos últimos anos alguns autores debruçaram-se sobre o estudo dos mecanismos de tolerância a metais pesados em rizóbio. Estes estudos revelaram a existência de sistemas de efluxo para o arsénio e cobre e também mecanismos intracelulares de quelação para o cádmio. No entanto, os estudos sobre os mecanismos de tolerância a metais pesados em espécies rizobianas continuam a ser escassos. Na sequência dos resultados obtidos nesta tese foram seleccionados alguns isolados e deram-se os primeiros passos no estudo dos mecanismos de tolerância em rizóbio. Nomeadamente ao nível das alterações nas proteínas na presença de cádmio assim como na pesquisa de genes de resistência. Deste modo, considero que a continuação deste trabalho poderia ser interessante para percebermos de que forma o rizóbio lida com o stresse metálico.

Capítulo 9

Referências Bibliográficas

Abaidoo, R.C., Keyser, H.H., Singleton, P.W., Borthakur, D., 2002. Comparison of molecular and antibiotic resistance profile methods for the population analysis of *Bradyrhizobium* spp. (TGx) isolates that nodulate the new TGx soybean cultivars in Africa. *Journal of Applied Microbiology* 92, 109-117.

Abd-Alla, M.H., Yan, F., Schubert, S., 1999. Effects of sewage sludge application on nodulation, nitrogen fixation, and plant growth of Faba, Bean, Soybean, and Lupin. *Journal of Applied Botany* 73, 69-75.

Achuba, F.I., Clarke, B.O.P., 2008. Effect of spent engine oil on soil catalase and dehydrogenase activities. *International Agrophysics* 22, 1-4.

Adam, G., Duncan, H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 943-951.

Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163, 173-181.

Aiking, H., Govers, H., van Riet, J., 1985. Detoxification of mercury, cadmium, and lead in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 1262-1267.

Akmal, M., Jianming, X., 2008. Dehydrogenase, urease and phosphatase activities as affected by Pb contamination in the soil. *Soil and Environment* 27, 139-142.

Alexandre, A., Laranjo, M., Oliveira, S., 2006. Natural populations of chickpea rhizobia evaluated by antibiotic resistance profiles and molecular methods. *Microbial Ecology* 51, 128-136.

- Allen, H.E., 2002. Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes, and plants. Pensacola: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), pp. 158.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 1331-1341.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Alloway, B.J., 1995a. Introduction. In: Alloway, B.J., (Ed.), *Heavy Metals in Soils*. Blackie Academic & Professional, New York, pp. 3-9.
- Alloway, B.J., 1995b. Soil processes and the behaviour of heavy metals. In: Alloway, B.J., (Ed.), *Heavy Metals in Soils*, Blackie Academic & Professional, New York, pp. 11-25.
- Alloway, B.J., 1995c. Cadmium. In: Alloway, B.J., (Ed.), *Heavy Metals in Soils*, Blackie Academic & Professional, New York, pp. 122-147.
- Alloway, B.J., Steinnes, E., 1999. Anthropogenic additions of cadmium to soils. In: McLaughlin, M.J., Singh, B.R., (Eds.), *Cadmium in Soils and Plants*, Kluwer Academic Publishers, pp. 98-119.
- Almeida, F.E.R., 1993. Técnicas tripotenciais e efeitos de orientação em polarização induzido. Dissertação de Doutorado, Universidade de Aveiro, pp. 346.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews* 59, 143-169.
- Anderson, P.R., Christensen, T.H., 1988. Distribution coefficients of Cd, Co, Ni, and Zn in soils. *Journal Soil Science* 39, 15-22.
- Angle, J.S., Chaney, R.F., Rhee, D., 1993a. Bacterial resistance to heavy metals related to extractable and total metal concentrations in soil and media. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 1443-1446.
- Angle, J.S., McGrath, S.P., Chaudri, A.M., Chaney, R.L., Giller, K.E., 1993b. Inoculation effects on legumes grown in soil previously treated with sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 575-580.
- Anisimova, L.A., Siunova, T.V., Boronin, A.M., 1993. Resistance to metals in Gram negative bacteria isolated from sewage and soils of industrial regions. *Microbiology* 62, 505-508.
- Antoun, H., Beauchamp, C.J., Goussard, N., Chabot, R., Lalande, R., 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil* 204, 57-67.

- Antoun, H., Prévost, D., 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui, J.A., (Ed.), PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer, Dordrecht, pp 1-3.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology 55, 373-99.
- Appelbaum, E.R., Thompson, D.V., Idler, K., Chartrain, N., 1988. *Bradyrhizobium japonicum* USDA 191 has two *nodD* genes that differ in primary structure and function. Journal of Bacteriology 170, 12-20.
- Arshad, M., Frankenberger, W.T., 1993. Microbial production of plant growth regulators. In: Blaine, F., Metting, Jr., (Eds.), Soil Microbial Ecology. Marcel and Dekker Inc., New York, pp. 307-347.
- Atlas, R.M., 1984. Use of microbial diversity measurements to assess environmental stress. In: Klug, M.J., Reddy, C.A., (Eds.), Current Perspectives in Microbial Ecology. American Society for Microbiology, Washington, pp 540-545.
- Atlas, R.M., Bartha, R., 1987. Interactions between microorganisms and plants. In: Mautner, S.M., (Ed.), Microbial Ecology, Fundamentals and Applications. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc., California, pp. 133-146.
- Avery, S.V., 2001. Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. Advances in Applied Microbiology 49, 111-142.
- Bååth, E., 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). Water Air and Soil Pollution 47, 335-379.
- Bååth, E., 1992. Measurement of heavy metal tolerance of soil bacteria using thymidine incorporation into bacteria extracted after homogenization-centrifugation. Soil Biology and Biochemistry 24, 1167-1172.
- Bååth, E., Díaz-Ravina, M., Frostegård, Å., Campbell, C.D., 1998. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. Applied and Environmental Microbiology 64, 238-245.
- Baldani, J.I., Weaver, R.W., 1992. Survival of clover rhizobia and their plasmid-cured derivatives in soil under heat and drought stress. Soil Biology and Biochemistry 24, 737-742.
- Bandick, A.K., Dick, R.P., 1999. Field management effects on soil enzyme activities. Soil Biology and Biochemistry 31, 1471-1479.
- Bano, N., Mussarat, J., 2003. Isolation and characterization of phorate degrading bacteria of agricultural significance. Letters in Applied Microbiology 46, 324-328.

- Baran, S., Bielinska, J.E., Oleszczuk, P., 2004. Enzymatic activity in an airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Geoderma* 118, 221-232.
- Barkey, T., Tripp, S.C., Olson, B.H., 1985. Effect of metal-rich sewage sludge application on the bacterial communities of grasslands. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 333-337.
- Baya, A.M., Brayton, P.R., Brown, V.L., Grimes, D.J., Russek-Cohen, E., Colwell, R.R., 1986. Coincident plasmids and antimicrobial resistance in marine bacteria isolated from polluted and unpolluted Atlantic Ocean samples. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 1285-1292.
- Beauchamp, J., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44, 276-287.
- Becana, M., Salin, M.L., 1989. Superoxide dismutases in nodules of leguminous plants. *Canadian Journal of Botany* 67, 415-421.
- Beck, A.J., Johnson, D.L., Jones, K.C., 1996. The form and bioavailability of non-ionic organic chemicals in sewage sludge-amended agricultural soils. *The Science of the Total Environment*, 185, 125-149.
- Belyaeva, O.N., Haynes, R.J., Birukova, O.A., 2005. Barley yield and soil microbial and enzyme activities as affected by contamination of two soils with lead, zinc or copper. *Biology and Fertility of Soils* 41, 85-94.
- Bergensen, F.J., 1965. Ammonia - an early stable product of nitrogen fixation by soybean root nodules. *Australian Journal of Biological Sciences* 18, 1-9.
- Beringer, J.E., Hirsch, P.R., 1984. Genetic engineering and nitrogen fixation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 1, 65-88.
- Beringer J.E., Ruiz Sainz, J.E. Johnston, A.W.B., 1984. Methods for the genetic manipulation of *Rhizobium*. In: Grainger, J.M., Lynch, J.M., (Eds.), *Microbial Methods for Environmental Biotechnology*. Society for Applied Bacteriology Technical Series, Academic Press, London, pp. 79-94.
- Beveridge, T.J., Murray, R.G.E., 1980. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 141, 876-887.
- Biró, B., Bayoumi, H.E.A.F., Balázs, S., Kecskés, M., 1995. Metal sensitivity of some symbiotic N₂-fixing bacteria and *Pseudomonas* strains. *Acta Biologica Hungarica* 46, 9-16.
- Bloem, J.F., Law, I.J., 2001. Determination of competitive abilities of *Bradyrhizobium japonicum* strains in soils from soybean production regions in South Africa. *Biology and Fertility of Soils* 33, 181-189.

- Boddey, R.M., Dobereiner, J., 1995. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. *Fertilizer Research* 42, 241-250.
- Bolton, Jr.H., Elliot, L.F., Papendick, R.I., Bezdicek, D.F., 1985. Soil microbial biomass and selected soil enzymes activities: effect of fertilization and cropping practices. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 297-302.
- Borges, A., Wollum, A., 1980. A field study of a soil-soybean plant-*Rhizobium* system amended with cadmium. *Journal of Environmental Quality* 9, 420-423.
- Borremans,B., Hobman, J.L., Provoost, A., Brown,N.L., van der Lelie, D., 2001.Cloning and functional analysis of the *pbr* lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *Journal of Bacteriology* 183, 5651-5658.
- Both, B., Krupp, G., Stackebrandt, E., 1991. Direct sequencing of double-stranded polymerase chain reaction-amplified 16S rDNA. *Analytical Biochemistry* 199, 216-218.
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inzé, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 83-116.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brady, N-C., Weil, R.R., 1996. The nature and properties of soil. Prentice- Hall, International, Inc, London.
- Brewing, N.J., Ambrose, M.J., Downie, J.A., 1993. Root nodules, *Rhizobium* and nitrogen fixation. In: Casey, R., Davies, D.R., (Eds.), *Peas: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*. Cab International, Wallingford, pp. 237-290.
- Broadbent, F.E., Nakashima, T., Chang, G.Y., 1982. Estimation of nitrogen fixation by isotope dilution in field and greenhouse experiments. *Agronomy Journal* 74, 625-628.
- Brockwell, J., 1963. Accuracy of a plant-Infection technique for counting populations of *Rhizobium trifolii*. *Applied Microbiology* 11, 377-383.
- Brockwell, J., Bottomley, P.J., 1995. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 683-697.
- Brockwell, J., Pilka, A., Holliday, R.A., 1991. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in central New South Wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 31, 211-219.
- Broos, K., Beyens, H., Smolders, E., 2005. Survival of rhizobia in soil is sensitive to elevated zinc in the absence of the host plant. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 573-579.

- Broos, K., Uyttendaele, M., Mertens, J., Smolders, E., 2004. A survey of symbiotic nitrogen fixation by white clover grown on metal contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 633-640.
- Brom, S., Santos, A.G., Girard, M.L., Dávila, G., Palacios, R., Romero, D., 1991. High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* plasmids. *Journal of Bacteriology* 173, 1344-1346.
- Brom, S., Santos, A.G., Stepkowski, T., Flores, M., Dávila, G., Romero, D., Palacios, R., 1992. Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *Journal of Bacteriology* 174, 5183-5189.
- Broughton, W.J., Jabbouri, S., Perret, X., 2000. Keys to symbiotic harmony. *Journal of Bacteriology* 182, 5641-5652.
- Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W., 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45, 198-207.
- Burns, R.G., 1982. Enzyme activity in soil, location and possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 14, 423-427.
- Burton, N.F., Day, M.J., Bull, A.T., 1982. Distribution of plasmids in clean and polluted sites in a South Wales river. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 1026-1029.
- Calderon, F.J., Jackson, L.E., Scow, K.W., Rolston, D.E., 2000. Microbial responses to simulated tillage in cultivated and uncultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1547-1559.
- Campbell, J.I.A., Jacobsen, S.C., Sorensen, J., 1995. Species Variation and plasmid incidence among fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. *FEMS Microbiology Ecology* 18, 51-62.
- Carareto A.L.M., Lemos, E.G.M., 1996. Use of lipopolysaccharide for immunological characterization of *Bradyrhizobium* sp. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 1227-1234.
- Carnelo, L.G.L., Ratto de Miguez, S., Marbán, L., 1997. Heavy metals input with phosphate fertilizers used in Argentina. *Science of the Total Environment* 204, 245-250.
- Carrasco, J.Á., Armario, P., Pajuelo, E., Burgos, A., Caviedes, M.A., López, R., Chamber, M.A., Palomares, A.J., 2005. Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1131-1140.
- Carter, J.M., Tieman, J.S., Gibson, A.H., 1995. Competitiveness and persistence of strains of Rhizobia for Faba Bean in acid and alkaline soils. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 617-623.
- Cash, T.P., Pan, Y., Simon, M.C., 2007. Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radical Biology and Medicine* 43, 1219-1225.

- Casida, L.E., Klein, D.A., Santoro, T., 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Science* 98, 371-376.
- Castro, I.V., 1999. Efeito da contaminação por metais pesados na simbiose *Rhizobium*-leguminosa. Tese Doutorado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa.
- Castro, I.V., Ferreira, E.M., McGrath, S.P., 1997. Effectiveness and genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates in Portuguese soils polluted by industrial effluents. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 1209-1213.
- Castro, I.V., Ferreira, E.M., McGrath, S.P., 2003. Survival and plasmid stability of rhizobial introduced into contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 49-54.
- Çakmakçı, R., Dönmez, F., Aydm, A., Şahin, F., 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1482-1487.
- Çelo, V., Babi, D., Baraj, B., Cullaj, A., 1999. An assessment of heavy metal pollution in the sediments along the Albanian coast. *Water, Air and Soil Pollution* 111, 235-250.
- CEC - Commission of the European Communities, 1986. Council Directive on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. Office Journal European Commission. L181, Annex 1A, 10.
- Ceribasi, H.I., Yetis, U., 2001. Biosorption of Ni (II) and Pb (II) by *Phanaerochate chrysosporium* from a binary metal system-kinetics. *Water Research* 27, 15-20.
- Cervantes, C., Gutierrez-Corona, F., 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 14, 121-138.
- Chander, K., Brookes, P.C., 1991. Effects of heavy metals from past applications of sewage sludge on microbial biomass and organic matter accumulation in a sandy loam and silty loam UK soil. *Soil Biology and Biochemistry* 23, 927-932.
- Chander, K., Brookes, P.C., 1993. Residual effects of zinc, copper and nickel in sewage sludge on microbial biomass in a sandy loam. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 1231-1239.
- Chander, K., Dyckmans, J., Joergensen, R.G., Meyer, B., Raubuch, M., 2001. Different sources of heavy metals and their long-term effects on soil microbial properties. *Biology and Fertility of Soils* 34, 241-247.
- Chang, A.S., Warneke, J.E., Page, A.L., Lund, L.J., 1984. Accumulation of heavy metals in sewage-treated soil. *Journal of Environmental Quality* 13, 87-91.
- Chaperon, S., Sauvé, S., 2007. Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2329-2338.

- Chaudhary, P., Dudeja, S.S., Kappor, K.K., 2004. Effectivity of host *Rhizobium leguminosarum* symbiosis in soils receiving sewage water containing heavy metals. *Microbiology Research* 159, 121-127.
- Chaudri, A.M., McGrath, S.P., Giller, K.E., 1992a. Metal tolerance of isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* from soil contaminates by past applications of sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 83-88.
- Chaudri, A.M., McGrath, S.P., Giller, K.E., 1992b. Survival of the indigenous population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soil spiked with Cd, Zn, Cu and Ni salts. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 625-632.
- Chaudri, A.M., McGrath, S.P., Giller, K.E., Angle, J.S., Chaney, R.L., 1993a. Screening of isolates and strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* for heavy metal resistance using buffered media. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 1643-1651.
- Chaudri, A.M., McGrath, S.P., Giller, K.E., Rietz, E., Sauerbeck, D.R., 1993b. Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soils previously treated with metal-contaminated sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 301-309.
- Chaudri, A.M., Allain, C.M.G., Jefferson, V.L.B., Nicholson, F.A., Chambers, B.J., McGrath, S.P., 2000. A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term fields experiment. *Plant and Soil* 221, 167-179.
- Chen, W.N., Moulin, L., Bonyemps, C., Vandamme, P., Bena, G., Boivin-Masson, C., 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by {beta}-proteobacteria wide spread in nature. *Journal of Bacteriology* 185, 7266-7272.
- Cho, U-H., Park, J-O., 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science* 156, 1-9.
- Chua, Y.K., Pankhurst, C.E., Macdonald, P.E., Hopcroft, D., Jarvis, B.D.W., Scott, D.B., 1985. Isolation and characterization of Tn5-induced symbiotic mutants of *Rhizobium loti*. *Journal of Bacteriology* 162, 335-343.
- Clare, D.A., Duong, M.N., Darr, D., Archibald, F., Fridovich, I., 1984. Effect of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. *Analytical Biochemistry* 140, 532-5.
- Clark, A.B., Kunkel, T.A., 2004. Cadmium inhibits the functions of eukaryotic MutS complexes. *Journal of Biological Chemistry* 279, 53903-53906.
- Collins, Y.E., Stotzky, G., 1992. Heavy metals alter the electrokinetic properties of bacteria, yeasts and clay minerals. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1592-1600.

- Colombo, C., Palumbo, G. Sannino, F., Gianfreda, L., 2002. Chemical and biochemical indicators for managed agricultural soils. 17th World Congress of Soil Science, Bangkok, Thailand, 1740, 1-9
- Cook, W.J., Kar, S.R., Taylor, K.B., Hall, L.M., 1998. Crystal structure of the cyanobacterial metallothioneine repressor SmtB: a model for metalloregulation proteins. *Journal of Molecular Biology* 275, 337-346.
- Corticeiro, S.C., Lima, A., Figueira, E., 2006. The importance of glutathione in oxidative status of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* under Cd exposure. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 132-137.
- Crovetto, C., 1997. La cero labranza y la nutrición del suelo. In: Agricultura sustentable de alta producción, ya!, 5º Congreso Nacional de AAPRESID, Mar del Plata, Argentina, pp. 73-78.
- Dar, G.H., 1996. Effects of sewage-sludge on soil microbial biomass and enzyme activities. *Bioresource Technology* 56, 141-145.
- Davies, B.E., 1989. Inter-relationships between soil properties and from the uptake of cadmium, copper, lead and zinc from contaminated soils by radish (*Raphanus sativus* L.). *Water Air and Soil Pollution* 63, 331-342.
- Davies, K.J.A., 2000. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. *IUBMB Life* 50, 279-289.
- Davis, R.D., 1984. Cadmium – a complex environmental problem. Part II. Cadmium in sludges used as fertilizer. *Experientia* 40, 117-234.
- Deaker, R., Roughley, R.J., Kennedy, I.R., 2004. Legume seed inoculation technology: a review. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1275-1288.
- de Bruijn, F.J., 1992. Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2180-2187.
- Decreto-Lei n.º 118/2006. Série I-A de 2006-06-21. Directiva n.º 86/278/CE.
- de Freitas, J.R., Banerjee, M.R., Germida, J.J., 1997. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.) *Biology and Fertility of Soils* 24, 358-364.
- de Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Mohamed, S.H., Torck, U., Coopman, R., Filali-Maltouf, A., Kersters, K., Dreyfus, B., Lindstrom, K., and Gillis, M., 1999. *Agrobacterium* strains isolated from nodules of tropical legumes. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 119-132.

de Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M. D., Dreyfus, B., Kersters, K., Gillis, M., 1994. Polyphasic taxonomy of Rhizobia - emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb nov, *Sinorhizobium saheli* sp nov, and *Sinorhizobium teranga* sp nov. International Journal of Systematic Bacteriology 44, 715-733.

Delorme, T.A., Gagliardi, J.V., Angle, J.S., van Berkum, P., Chaney, R.L., 2003. Phenotypic and Genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of clover grown in a zinc and cadmium contaminated soil. Soil Science Society of American Journal 67, 1746-1754.

de Maagd, R.A., van Rossum, C., Lugtenberg, B.J., 1988. Recognition of individual strains of fast-growing rhizobia by using profiles of membrane proteins and lipopolysaccharides. Journal of Bacteriology 170, 3782-3785.

de Weger, L.A., Jann, B., Jann, K., Lugtenberg, B., 1987. Lipopolysaccharides of Pseudomonas spp. that stimulate plant growth: composition and use for strain identification. Journal of Bacteriology 169, 1441-1446.

Díaz-Raviña, M., Bååth, E., 1996. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. Applied and Environmental Microbiology 62, 2970-2977.

Díaz-Raviña, M., Bååth, M.E., Frostegård, A., 1994. Multiple heavy metal tolerance of soil bacterial communities and its measurement by thymidine incorporation technique. Applied and Environmental Microbiology 60, 2238-2247.

Dick, R.P., 1994. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. In: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, D.A., (Eds.), Defining Soil Quality for a Sustainable Environment, Soil Science Society of America, Madison, pp. 107-124.

Dick, R.P., 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., (Eds.), Biological indicators of soil health. USA: CAB International, Wallingford, pp. 121-156.

Dick, W.A., Cheng, L., Wang, P. 2000. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. Soil Biology and Biochemistry 32, 1915-1919.

Dick, W.A., Juma, N.G., Tabatabai, M.A., 1983. Effects of soils on acid phosphatase and inorganic pyrophosphatase of corn roots. Soil Science 136, 19-25.

Dimitrijevic, L., Puppo, A., Rigaud, J., 1984. Superoxide dismutase activities in *Rhizobium phaseoli* bacteria and bacteroids. Archives in Microbiology 139, 174-178.

Doeglas, D.J., 1968. Grain-size indices, classification and environment. Sedimentology 10, 8-82.

- Doelman, P., Haanstra, L., 1989. Short- and long-term effects of heavy metals on phosphatase activity: an ecological dose-response model approach. *Biology and Fertility of Soils* 8, 235-241.
- Doelman, P., Jansen, E., Michels, M., van Til, M., 1994. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biology and Fertility of Soils* 17, 177-184.
- Doran, J.W., Parkin, T.B., 1994. Defining and assessing soil quality. In: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A. (Eds.), *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. SSSA Special Publication, Madison, pp. 3-21.
- Dowling, D.N., Broughton, W.J., 1986. Competition for nodulation of legumes. *Annual Reviews Microbiology* 40, 131-157.
- Downie, J.A., Johnston, A.W.B., 1988. Nodulation of legumes by *Rhizobium*. *Plant Cell Environment* 11, 403-412.
- Dreyfus, B., Garcia, J.L., Gillis, M., 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen nov, sp nov, a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38, 89-98.
- Drijber, R.A., Doran, J.W., Parkhurst, A.M., Lyon, D.J., 2000. Changes in soil microbial community structure with tillage under long-term wheat-fallow management. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1419-1430.
- Drozdowicz, A.G., 1991. Microbiologia ambiental. In: Roitman, I., Travassos, I.R., Azevedo, J.L., (Eds.). *Tratado de microbiologia*. Rio de Janeiro: Manole, pp. 1-102.
- Dudka, S., Adriano, D.C., 1997. Environmental impacts of metal ore mining and processing: a review. *Journal Environmental Quality* 26, 590-602.
- Duhan, J.S., Dudeja, S.S., Khurana, A.L., 1998. Siderophore production in relation to N₂ fixation and iron uptake in pigeonpea-*Rhizobium* symbiosis. *Folia Microbiology* 43, 421-426.
- Dunlap, P.V., Steinman, H.M., 1986. Strain variation in bacteriocuprein superoxide dismutase from symbiotic *Photobacterium leiognathi*. *Journal of Bacteriology* 165,393-398.
- Dupuy, N., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Vandenbruaene, I., Maestrojuan, G., Dreyfus, B., Kersters, K., Collins, M.D., Gillis, M., 1994. Phenotypic and genotypic characterization of Bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 461-473.
- Eardly, B.D., Young, J.P.W., Selander, R.K., 1992. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1809-1815.

- Eckhardt, T., 1978. Rapid method for identification of plasmid deoxyribonucleic-acid in bacteria. *Plasmid* 1, 584-588.
- Edwards, C.A., 2002. Assessing the effects of environmental pollutants on soil organism, communities, processes and ecosystems. *European Journal of Soil Biology* 38, 225-231.
- Eijsackers H., 1998. Soil quality assessment in an international perspective: generic and land-use based quality standards. *Ambio: A Journal of the Human Environment* 27, 70-77.
- Eivazi, F., Tabatabai, M.A., 1977. Phosphatases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 9, 167-172.
- El-Aziz, R., Angle, J.S., Chaney, R.L., 1991. Metal tolerance of *Rhizobium meliloti* isolated from heavy-metal contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 23, 795-798.
- Elboutahiri, N., Thami-Alami, I., Zaïd, E., Udupa, S.M., 2009. Genotypic characterization of indigenous *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium sllae* by rep-PCR, RAPD and ARDRA analyses. *African Journal of Biotechnology* 8, 979-985.
- El-Kenawy, Z.A., Angle, J.S., Gewaily, E.M., El-Wafai, N.A., van Berkum, P., Rufus, L.C., Ibekwe, M.A., 1997. Zinc and cadmium effects on the early stages of nodulation in white clover. *Agronomy Journal* 89, 875-880.
- Elliot, E.T., 1994. The potential use of biotic activity as an indicator of productivity. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, P.R., (Eds.), *Soil Biota: management in sustainable farming systems*. CSIRO, Melbourne, pp. 250-256.
- Ellis, R.J., Morgan, P., Weightman, A.J., Fry, J.C., 2003. Cultivation dependent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3223-3230.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82, 70-77.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1, 529-539.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* 11, 81-128.
- Evangelou, V.P., Zhang, Y.L., 1995. A review: pyrite oxidation mechanisms and acid mine drainage prevention. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 25, 141-199.
- Faisal, M., Hasnain, S., 2005. Bacterial Cr (VI) reduction concurrently improves sunflower (*Helicanthus annuus* L.) growth. *Biotechnology Letters* 27, 943-947.

- Farr, S.B., Kogoma, T., 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiology Reviews* 55, 561-585.
- Fernández, P., Sommer, I., Cram, S., Rosas, I., Gutiérrez, M., 2005. The influence of water-soluble As(III) and As (V) on dehydrogenase activity in soils affected by mine tailings. *Science of Total Environment* 348, 231-243.
- Ferreira, E.M., Marques, J.F., 1992. Selection of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains for production of legumes inoculants. I. Screening for effectiveness in laboratory conditions. *Plant and Soil* 147, 151-158.
- Filip, Z., 2002. International approach to assessing soil quality by ecologically related biological parameters. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 88, 169-174.
- Fink, C.R., Waggoner, P.E., Ausubel, F., 1999. Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1175-1180.
- Fisher, R.F., Long, S.R., 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature*. 357, 660-665.
- Flaishman, M.A., Eyal, Z.A., Zilberstein, A., Voisard, C., Hass, D., 1996. Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide producing strains of *Pseudomonas putida*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 9, 642-645.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2003. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119, 355-364.
- Foyer, C.H., Descourvieres, P., Kunert, K.J., 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell and Environment* 17, 507-523.
- Franco, A.A., Döbereiner, J., 1994. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa Phytopathologica* 20, 68-74.
- Frankenberger, W.T.J., Arshad, M., 1995. *Phytohormones in soil: Microbial production and function*. Marcel Dekker, New York, pp. 503.
- Freedman, B., Hutchinson, T.C., 1980. Effects of smelter pollutants on forest litter decomposition near a nickel copper smelter at Sudbury, Ontario. *Canadian Journal of Botany* 58, 1722-1736.
- Freiberg, C., Fellay, R., Bairochm, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A., Perret, X., 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature* 387, 394-401.
- Fridovich, I., 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology* 201, 1203-1209.
- Gadd, G.M., 1992. Metals and microorganisms: A problem of definition. *FEMS Microbiology Letters* 100, 197-204.

- Gadd, G.M., Griffiths, A.J., 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology* 4, 303-317.
- Gallego, S.M., Benavides, M., Tomaro, M., 2002. Involvement of antioxidant defense system in the adaptive response to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regulation* 36, 267-273.
- García, C., Hernández, T., 1997. Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 171-177.
- García-de-los Santos, A., Brom, S., Romero, D., 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria legume interactions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12, 119-125.
- García de Salamone, I.E., Hynes, R.K., Nelson, L.M., 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology* 47, 404-411.
- Gerlach, D., Reichardt, W., Vettermann, S., 1998. Extracellular superoxide dismutase from *Streptococcus pyogenes* type 12 strain is manganese-dependent. *FEMS Microbiology Letters* 160, 217-224.
- Ghezzi, P., Bonetto, V., 2003. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* 3, 1145-1153.
- Ghorbani, N.R., Salehrastin, N., Moeini, A., 2002. Heavy metal affect the microbial populations and their activities. Symposium no. 54, 17th WCSS, Thailand.
- Ghosh, A.K., Bhattacharyya, P., Pal, R., 2004. Effect of arsenic contamination on microbial biomass and its activities in arsenic contaminated soils of Gangetic West Bengal, India. *Environment International* 30, 491-499.
- Gianfreda, L., Bollag, J.M., 1996. Influence of natural and anthropogenic factors on soil enzyme activity in soil. In: Stotzky, G., Bollag, J.M., (Eds.), *Soil Biochemistry*, vol 9, Marcel Dekker, New York, pp. 123-193.
- Gianfreda, L., Rao, M.A., Piotrowska, A., Palumbo, G., Colombo, C., 2005. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. *Science of Total Environment* 341, 265-279.
- Giller, K.E., Beare, M.H., Lavelle, P., Izac, A.-M.N., Swift, M.J., 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology* 6, 3-16.
- Giller, K.E., McGrath, S.P., 1989. Muck, metals and microbes. *New Scientist* (4 November 1989), 31-32.

- Giller, K.E., McGrath, S.P., Hirsch, P.R., 1989. Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*. *Soil Biology and Biochemistry* 21, 841-848.
- Giller, K.E., Nussbaum, R., Chaudri, A.M., McGrath, S.P., 1993. *Rhizobium meliloti* is less sensitive to heavy-metal contamination in soil than *R. leguminosarum* bv. *trifolii* or *R. loti*. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 273-278.
- Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial process in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1389-1414.
- Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P., 2009. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 2031-2037.
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S., 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 877-887.
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 109-117.
- Golstein, A.H., 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture* 1, 57-65.
- González-Flecha, B., Demple, B., 1995. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *Journal of Biology Chemistry* 270, 13681-13687.
- Goodfellow, M., 2000. Introduction. Microbial systematic: background and uses. In: Priest, F.G., Goodfellow, M., (Eds.), *Applied Microbial Systematics*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 1-18.
- Graham, P.H., 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil-conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 475-484.
- Graham, P.H., Draeger, K.J., Ferrey, M.L., Conroy, M.J., Hammer, B.E., Martinez, E., Aarons, S.R., Quinto, C., 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* Umr1899. *Canadian Journal of Microbiology* 40, 198-207.
- Graham, P.H., Vance, C.P., 2000. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research* 65, 93-106.
- Graham, P.H., Viteri, S.E., Mackie, F., Vargas, A.A.T., Palacios, A., 1982. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Research* 5, 121-128.
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P., Azevedo, R., 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* 32, 481-494.

- Gray, E.J., Smith, D.L., 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 395-412.
- Guo, J.H., Qi, H.Y., Guo, Y.H., Ge, H.L., Gong, L.Y., Zhang, L.X., 2004. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control* 29, 66-72.
- Guo-Li, L., Da-xue, L., Quan-ming, L., 2008. Heavy metals contamination characteristics in soil of different mining activity zones. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 18, 207-211.
- Gülser, F., Erdoğan, E., 2008. The effects of heavy metal pollution on enzyme activities and basal soil respiration of roadside soils. *Environmental Monitoring and Assessment* 145, 127-133.
- Guzzo, A., Du Bow, M., Bauda, P., 1994. Identification and characterization of genetically programmed responses to toxic metal exposure in *Escherichia*. *Metals and microorganisms: relationships and applications*. FEMS Microbiology Reviews 14, 369-374.
- Hada, H.S., Sizemore, R.K., 1981. Incidence of plasmids in marine *Vibrio* spp. isolated from an oil field in the North Western Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 199-202.
- Haferburg, G., Knothe, E., 2007. Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology* 47, 453-467.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry Journal* 219, 1-14.
- Hameed, S., Yasmin, S., Malik, K.A., Zafar, Y., Hafeez, Y., 2004. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strains isolated from cultivated legumes. *Biology and Fertility of Soils* 39, 179-185.
- Handley, B.A., Hedges, A.J., Beringer, J.E., 1998. Importance of host plants for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 241-249.
- Hartman, A., Giraud, J.J., Catroux, G., 1998. Genetic diversity of *Sinorhizobium* (formerly rhizobia) *meliloti* strain isolated directly from a soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) grown in the same soil. *FEMS Microbiology Ecology* 25, 107-16.
- Harrison, S.P., Jones, D.G., Schunmann, P.H.D., Forster, J.W., Young, J.P.W., 1988. Variation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Sym plasmids and the association with effectiveness of nitrogen fixation. *Journal of General Microbiology* 134, 2721-2730.
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., Boudabous, A., 1998. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology* 64, 7-15.
- Hayano, K., Tubaki, K., 1985. Origin and properties of b-glucosidase activity of tomato field soil. *Soil Biology and Biochemistry* 17, 53-557.

- He, Z.L., Yang, X.E., Stoffellab, P.J., 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19, 125-140.
- Helander, I.M., Mamat, U., Rietschel, E.T., 2001. Lipopolysaccharides. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group.
- Héroutart, D., Sigaud, S., Moreau, S., Frendo, P., Touati, D., Puppo, A., 1996. Cloning and characterization of the *katA* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase. *Journal of Bacteriology* 178, 6802-6809.
- Hidalgo, A., Betancor, L., Moreno, R., 2004. *Thermus thermophilus* as a cell factory for the production of a thermophilic Mn dependent catalase which fails to be synthesized in an active form in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3839-3844.
- Higgins, I.J., Burns, R.G., 1975. The chemistry and microbiology of pollution. Academic Press, London.
- Hinojosa, M.B., García-Ruiz, R., Viñegla, B., Carreira, J.A., 2004a. Microbiological rates and enzyme activities as indicators of functionality in soils affected by the Aznalcóllar toxic spill. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1637-1644.
- Hinojosa, M.B., Carreira, J.A., García-Ruiz, R., Dick, R.P. 2004b. Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1559-1568.
- Hippeli, S., Heiser, I., Elstner, E.F., 1999. Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 37, 167-178.
- Hirsch, P.R., 1996. Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytologist* 133, 159-171.
- Hirsch, P.R., Jones, M.J., McGrath, S.P., Giller, K.E., 1993. Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *trifolii* populations. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 1485-1490.
- Hitchcock, P.J., Brown, T.M., 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Bacteriology* 154, 269-277.
- Höflich, G., Wiehe, W., Kühn, G., 1994. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. *Experientia* 50, 897-905.
- Hubbell, D.H., 1993. Screening for inoculant-quality strains of Rhizobia. In: Bernard, R.G., Thompson, J.E., (Eds.), *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, pp. 321-329.

- Hughes, D., 2000 Evaluating genome dynamics: the constraints on rearrangements within bacterial genomes. *Genome Biology* 1, 1-8.
- Humpris, K.M., Sweda, L.I., 1998. Selective inactivation of α -ketoglutarate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* 37, 15835-15841.
- Hungria, M., Vargas, M.A.T., 2000. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research* 65, 151-164.
- Huysman, F., Verstraete, W., Brookes, P.C., 1994. Effect of manuring practices and increased copper concentrations on soil microbial populations. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 103-110.
- Hynes, M.F., McGregor, N.F., 1990. Two plasmid other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Microbiology* 4, 567-574.
- Ibekwe, A.M., Angle, J.S., Chaney, R.L., van Berkum, P., 1995. Sewage sludge and heavy metal effects on nodulation and nitrogen fixation of legumes. *Journal of Environmental Quality* 24, 1199-1204.
- Ibekwe, A.M., Angle, J.S., Chaney, R.L., van Berkum, P., 1997. Differentiation of clover *Rhizobium* isolated from biosolids-amended soils with varying pH. *Soil Science Society of American Journal* 61, 1679-1685.
- Ibekwe, A.M., Angle, J.S., Chaney, R.L., van Berkum, P., 1998. Zinc and cadmium effects on *Rhizobia* and white clover using chelator-buffered nutrient solution. *Soil Science Society of American Journal* 62, 204-211.
- Irha, N., Slet, J., Petersell, V., 2003. Effect of heavy metals and PAH on soil assessed via dehydrogenase assay. *Environment International* 28, 779-782.
- Israr, M., Sahi, S., 2006. Antioxidant response to mercury in the cell cultures of *Sesbania drummondii*. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 590-595.
- Jackman, P.J.H., 1985. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: Goodfellow M., Minnikin, D.E., (Eds.), *Chemical methods in bacterial systematics*, Academic Press, Orlando, pp. 115-129.
- Jaeger, K.E., Randac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O., 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews* 15, 29-63.
- Jain, D.K., Tyagi, R.D., 1992. Leaching of heavy metals from anaerobic sewage sludge by sulphur-oxidizing bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* 14, 376-383.

- Jarvis, B.D.W., van Berkum, P., Chen, W.X., Nour, S.M., Fernandez, M.P., Cleyet-Marel, J.C., Gillis, M., 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 47, 895-898.
- Jensen, H.L., 1942. The occurrence of variant types in root-nodule bacteria. Australian Journal of Science. 5, 69.
- Ji, G., Silver, S., 1995. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. Journal of Industrial Microbiology 14, 61-75.
- Johansson, L.H., Borg, L.A.H., 1988. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. Analytical Biochemistry 174, 331-336.
- Joho, M., Inouhe, M., Tohoyama, H., Murayama, T., 1995. Nickel resistance in yeast and other fungi. Journal Industrial Microbiology 14, 164-168.
- Jordan, D.C., 1984. Family III, *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: Holt, J.G., (Ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 234-256.
- Judd, A.K., Schneider, M., Sadowsky, M.J., de Bruijn, F.J., 1993. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. Applied and Environmental Microbiology 59, 1702-1708.
- Kabata-Pendias, A. 2004. Soil-plant transfer of trace elements an environmental issue. Geoderma 122, 143-149.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace Elements in Soils and Plants, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA
- Kandeler, E., Kampichler, C., Horak, O., 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil communities. Biology and Fertility of Soils 23, 299-306.
- Karlen, D.L., mausbach, M.J., Doran, J.W., Cline, R.G., Harris, R.F., Schuman, G.E., 1997. Soil quality: a concept, definition and framework for evaluation. Soil Science Society of American Journal 61, 4-10.
- Karthikeyan, A.S., Varadarajan, D.K., Mukatira, U.T., D'Urzo, M.P., Damaz, B., Raghothama, K.G., 2002. Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. Plant Physiology 130, 221-233.
- Kijne, J.W., 1992. The *Rhizobium* infection process. In: Stacey, G., Burris, R.H., Evans, H.J., (Eds.), Biological nitrogen fixation. Chapman & Hall, New York, pp. 348-397.

- Kim, E.J., Chung, H.J., Suh, B.Y., Hah, C., Roe, J.H., 1998. Transcriptional and post-transcriptional regulation by nickel of *sodN* gene encoding nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces coelicolor* Müller. *Molecular Microbiology* 27, 187-195.
- Kim, K.Y., McDonald, G.A., Jordan, D., 1997. Solubilization of hydroxypatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biology and Fertility of Soils* 24, 347-352.
- Kinkle, B.K., Angle, J.S., Keyser, H.H., 1987. Long term effects of metal-rich sewage sludge application on soil population of *Bradyrhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 315-319.
- Kizilkaya, R., Bayrakli, B., 2005. Effects of N-enriched sewage sludge on soil enzyme activities. *Applied Soil Ecology*, 192-202.
- Kizilkaya, R., Askin, T., Bayrakli, B., Sağlam, M., 2004. Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals. *European Journal of Soil Biology* 40, 95-102.
- Klein, D.A., Sorensen, D.L., Redente, E.F., 1985. Soil enzymes: a predictor of reclamation potential and progress. In: Tate, R.L., Klein, D.A., (Eds.), *Soil Reclamation Process. Microbiological Analyses and Applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 273-340.
- Kloepper, J.W., Schroth, M.N., 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Fourth International Conference on Plant Pathogen Bacteria, Angers, France*, vol 2, pp. 879-882.
- Klucas, R.V., Hanus, F.J., Russell, S.A., Evans, H.J., 1983. Nickel: A micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 2253-2257.
- Kondorosi, A., Charon, C., Frugier, F., Foucher, F., Nalland, M., Roudier, F., Johansson, C., Cebolla, A., Sousa, C., Jimenez-Zurdo, J.I., Mergaert, P., Staehelin, C., Schultze, M., Crespi, M., Kondorosi, E., Felle, E., 1998. The role of Nod factors in root nodule organogenesis. In: Arrese-Igor, C., Royuela, M., Aparicio-Tejo, P.M., (Eds.), *Perspectivas de la fijación de nitrógeno en el umbral del siglo XX. Libro de Resúmenes de la VII Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno*, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, pp 3-10.
- Kumar, B., Kumar, M.S., Annapurna, K., Maheshwari, D.K., 2006. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobia isolated from a medicinal legume, *Mucuna pruriens* Linn. *Current Science* 91, 1524-1529.
- Kupperman, R.G., Carreiro, M.M., 1997. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 179-190.

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laguerre, G., Allard, M.R., Revoy, F., Amarger, N., 1994. Rapid identification of Rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 56-63.
- Laguerre, G., Courde, L., Nouaïm, R., Lamy, I., Revellin, C., Breuil, M.C., Chaussod, R., 2006. Response of rhizobial populations to moderate copper stress applied to an agricultural soil. *Microbial Ecology* 52, 426-435.
- Laguerre, G., Geniaux, E., Mazurier, S.I., Casartelli, R.R., Amarger, N. 1993. Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 412-419.
- Laguerre, G., Mavingui, P., Allard, M.R., Charnay, M.P., Louvrier, P., Mazurier, S.I., Rigottier-Gois, L., Amarger, N., 1996. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2029-2036.
- Laguerre, G., Mazurier, S.I., Amarger, N., 1992. Plasmid profiles and restriction-fragment-length-polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. *FEMS Microbiology Ecology* 101, 17-26.
- Laguerre, G., Nour, S.M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., Amarger, N., 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147, 981-993.
- Lakzian, A., Karimi, E., Khavazi, K., Haghnia, G., 2008. Genetic diversity of *Sinorhizobium meliloti* isolated from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) growing in Hamadan soils (Iran) using plasmid profile and PCR/RFLP. *International Journal of Agriculture and Biology* 10, 669-672.
- Lakzian, A., Murphy, P., Turner, A., Beynon, J.L., Giller, K.E., 2002. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 519-529.
- Laranjo, M., Machado, J., Young, P.J., Oliveira, S., 2004. High diversity of chickpea *Mesorhizobium* species isolated in a Portuguese agricultural region. *FEMS Microbiology Ecology* 48, 101-107.
- Laranjo, M., Rodrigues, R., Alho, L., Oliveira, S., 2001. Rhizobia of chickpea from southern Portugal: symbiotic efficiency and genetic diversity. *Journal of Applied Microbiology* 90, 662-667.
- Larsonneur, C., 1977. La cartographie des depots meubles sur le plateau continental français: méthode mise au point et utilisée en Manche. *Journal Recherche Océanographique* 2, 33-39.

- Lee, S., Kim, O.K., Chang, Y., Bae, B., Kim, H.H., Baek, K.H. 2002. Heavy metal concentrations and enzyme activities in soil from a contaminated Korean shooting range. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94, 406-411.
- Lestan, D., Luo, C.L., Li, X.D., 2008. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: a review. *Environmental Pollution* 153, 3-13.
- Lester, J.N., Sterriet, R.M., Kirk, P.W.W., 1983. Significance and behavior of metals in wastewater treatment processes, part I, Sewage treatment and effluent discharge. *Science of Total Environment* 30, 1-44.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186, 464-478.
- Levinson, H.S., Mahler, I., 1998. Phosphatase activity and lead resistance in *Citrobacter freundii* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 161, 135-138.
- Leung, K., Bottomley, P.J., 1994. Growth and nodulation characteristics of subclover (*Trifolium subterraneum* L.) and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* at different soil water potentials. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 805-812.
- Li, W.H., 1997. Molecular evolution. Sinauer Associates, pp. 100-126.
- Li, Z.S., Lu, Y.P., Zhen, R.G., Szcycka, M., Thiele, D.J., Rea, P.A., 1997. New pathway for cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalized transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 42-47.
- Lima, A., Corticeiro, S., Figueira, E., 2006. Glutathione-mediated cadmium sequestration in *Rhizobium leguminosarum*. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 763-769.
- Lima, A.S., Pereira, J.P.A.R., Moreira, F.M.S., 2005. Phenotypic diversity and symbiotic efficiency of *Bradyrhizobium* spp. strains from Amazonian soils. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40, 1095-1104.
- Liu, J., Zhang, Y., Huang, D., Song, G., 2005. Cadmium induced MTs synthesis via oxidative stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biochemistry* 280, 139-145.
- Liu, X.Y., Wang, E.T., Li, Y., Che, W.X., 2007. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* grown in the subtropical regions of China. *Archives in Microbiology* 188, 1-14.
- Lindström, K., Zahran, H.H., 1993. Lipopolysaccharide patterns in SDS-PAGE of rhizobia infecting leguminous trees. *FEMS Microbiology Letters* 107, 327-330.

- Liphadzi, M.S., Kirkham, M.B., Paulsen, G.M., 2006. Auxin-enhanced root growth for phytoremediation of sewage-sludge amended soil. *Environmental Technology* 27, 695-704.
- Long, S.R., 1989. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56, 203-214.
- Lopez, M.L., Peralta-Videa, J.R., Benitez, T., Gardea-Torresdey, J.L., 2005. Enhancement of lead uptake by alfalfa (*Medicago sativa*) using EDTA and a plant growth promoter. *Chemosphere* 61, 595-598.
- Lopez, M.L., Peralta-Videa, J.R., Parsons, J.G., Benitez, T., Gardea-Torresdey, J.L., 2007. Gibberellic acid, kinetin, and the mixture indole-3-acetic acid-kinetin assisted with EDTA-induced lead hyperaccumulation in alfalfa plants. *Environmental Science and Technology* 41, 8165-8170.
- Louvrier, P., Laguerre, G., Amarger, N., 1996. Distribution of symbiotic genotypes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations isolated directly from soil. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4202-4205.
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why Is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environmental Science Technology* 39, 1921-1931.
- Lushchak, V.I., 2001. Oxidative stress and Mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry* 66, 476-489.
- Lynch, J.M., 1988. The terrestrial environment. In: Lynch, J.M., Hobbie, J.E., (Eds.), *Microorganisms in action: concepts and applications in microbial ecology*. Blackwell, Oxford, UK, pp. 103-131.
- Machulla, G., 2003. Soil microbial indicators and their environmental significance. *Journal. Soils and Sediments* 3, 229.
- Malik, A., 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environmental International* 30, 261-278.
- Malik, A., Ahmad, M., 2002. Seasonal variation in bacterial flora of the wastewater and soil in the vicinity of industrial area. *Environmental Monitoring and Assessment* 73, 263-273.
- Majer, B.J., Tschierko, D., Paschke, A., 2002. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. *Mutation Research* 515, 111-124.
- Manyani, H., Sousa, C., Soria-Díaz, M.E., Gil-Serrano, A., Megías, M., 2001. Regulation of nod factor sulphation genes in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Canadian Journal of Microbiology* 47, 574-579.

- Margesin, R., Zimmerbauer, A., Schinner, F., 1999. Soil lipase activity – a useful indicator of oil biodegradation. *Biotechnology Techniques* 13, 859-863.
- Margesin, R., Zimmerbauer, A., Schinner, F., 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* 40, 339-346.
- Margesin, R., Feller, G., Hämmerle, M., Stegner, U., Schinner, F., 2002. A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. *Biotechnology Letters* 24, 27-33.
- Mårtensson, A.M., 1992. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seed legumes. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 435-445.
- Martinez, E., Romero, D., Palacios, R., 1990. The *Rhizobium* genome. *Critical Reviews of Plant Science* 9, 59-93.
- Marvel, D.J., Kuldau, G., Hirsch, A., Richards, E., Torrey, J.G., Frederick, M.A., 1995. Conservation of nodulation genes between *Rhizobium meliloti* and a slow-growing *Rhizobium* strain that nodulates a non legume host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 5841-5845.
- Marzadori, C., Ciavatta, C., Montecchio, D., Gessa, C., 1996. Effects of lead pollution on different soil enzyme activities. *Biology and Fertility of Soils* 22, 53-58.
- Matsuda, A., Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O., 2002. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37, 343-355.
- McBride, M.B., 1994. *Environmental chemistry of soils*. Oxford University Press, New York.
- McGrath, S.P., Brookes, P.C., Giller, K.E., 1988. Effects of potential toxic metals in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. *Soil Biology and Biochemistry* 20, 415-424.
- McGrath, S.P., Chaudri, A.M., Giller, K.E., 1995. Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *Journal of Industrial Microbiology* 14, 94-104.
- McGrath, S.P., Lane, P.W., 1989. An explanation for the apparent losses of metals in a long-term field experiment with sewage sludge. *Environmental Pollution* 60, 235-256.
- Mendes, C.M., Almeida, J.C., Botelho, M.L., Cavaco, M.C., Almeida-Varo, E., Andrade, M.E., 1990. The portuguese gamma irradiation facility. *Radiation Physics and Chemistry* 15, 576-579.
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H.G., Gerits, J., Charles, P., Van Gijsegem, F., 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology* 162, 328-334.

- Mhamdi, R., Laguerre, G., Aouani, M.E., Mars, M., Amarger, N., 2002. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiology Ecology* 41, 77-84.
- Michelutti, B., Wiseman, M. 1995. In: Lal, R., Stewart, B.A., (Eds.), *Environmental Restoration of the Industrial City*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 135-141.
- Mikanova, O., 2006. Effects of heavy metals on some soil biological parameters. *Journal of Geochemical Exploration* 88, 220-223.
- Misra, T.K., 1992. Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid* 27, 4-16.
- Moller, I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 561-591.
- Moreno, J.L., Hernández, T., Pérez, A., García, C., 2002. Toxicity of cadmium to soil microbial activity: effect of sewage sludge addition to soil on the ecological dose. *Applied Soil Ecology* 21, 149-158.
- Moreira, F.M.S., Carvalho, Y., Gonçalves, M., Haukka, K., Young, P.J.W., Faria, S.M., Franco, A.A., Cruz, I.M., Pedrosa, F.O., 2000. *Azorhizobium johannense* sp.nov. and *Sesbania virgata* (CAZ.) PERS. A highly specific symbiosis. In: Pedrosa, F.O., Hungria, M., Yates, M.G., Newton, W.E., (Eds.), *Nitrogen fixation: From Molecules to Crop Productivity*. Kluwer Academic Publishers, London, pp. 197.
- Moreira, F.M.S., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K., Franco, A.A., 1993. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrilamide gel electrophoresis of their total proteins. *Systematic and Applied Microbiology* 16, 135-146.
- Mortvedt, J.J., Beaton, J.D., 1995. Heavy metal and radionuclide contaminants in phosphate fertilizers. In: Tiessen, H., (Ed.), *Phosphorus in the global environment: transfer, cycles and management*. Wiley, New York, pp. 93-106.
- Mrabet, M., Mnasri, M., Romdhane, S.M., Laguerre, G., Aouani, M.E., Mhamdi, R., 2006. *Agrobacterium* strains isolated from root nodules of common bean specifically reduce nodulation by *Rhizobium gallicum*. *FEMS Microbiology Ecology* 56, 304-309.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* 60, 193-207.
- Nannipieri, P., 1994. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., (Eds.), *Soil biota: management in sustainable farming systems*. CSIRO, Melbourne, pp. 238-244.

Nannipieri, P., Ceccanti, B., Grego, S., 1990. Ecological significance of biological activity in soil, In: Bollag, J.M., Stotzky, G., (Eds.), Soil Biochemistry, vol 6. Marcel Dekker, New York, pp. 293-355.

Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), Enzymes in the Environment. Activity, Ecology and Applications. Marcel Dekker, New York, pp. 1-33.

Nannipieri, P., Pechozzini, F., Arcada, P.G., Pioranelli, C., 1979. Changes in amino acids, enzyme activities and biomass during soil microbial growth. Soil Science 127, 26-34.

Nicholson, F.A., Smith, S.R., Alloway, B.J., Carlton-Smith, C., Chambers, B.J., 2003. An inventory of heavy metal inputs to agricultural soils in England and Wales. The Science of the Total Environment 311, 205-219.

Nick, G., de Lajudie, P., Eardly, B.D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., Gillis, M., Lindstrom, K., 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. International Journal of Systematic Bacteriology 49, 1359-1368.

Nies, D.H., 1992. Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes. Plasmid 27, 17-28.

Nies, D.H., 1995. The cobalt, zinc, cadmium efflux system *czcABC* from *Alcaligenes eutrophus* functions as an action-proton antiporter in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 177, 2707-2712.

Nies, D.H., 1999. Microbial heavy-metal resistance. Applied Microbiology Biotechnology 51, 730-750.

Nies, D.H., Silver, S., 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. Journal of Industrial Microbiology 14, 186-199.

Noctor, G., Foyer, C., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49, 249-279.

Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H., 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. Journal of Experimental Botany 53, 1283-1304.

Noel, T.C., Sheng, C., Yost, C.K., Pharis, R.P., Hynes, M.F., 1996. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. Canadian Journal of Microbiology 42, 279-283.

Nordgren, A., Kauri, T., Bååth, E., Söderström, B., 1986. Soil microbial activity, mycelial lengths and physiological groups of bacteria in a heavy metal polluted area. Environmental pollution 41, 89-100.

- Obbard, J.P., 2001. Ecotoxicological assessment of heavy metals in sewage sludge amended soils. *Applied Geochemistry* 16, 1405-1411.
- Obbard, J.P., Jones, K.C., 1993. The effect of heavy metals on dinitrogen fixation by *Rhizobium*-white clover in a range of long-term sewage sludge amended and metal contaminated soils. *Environmental Pollution* 79, 105-112.
- Obbard, J.P., Sauerbeck, D.R., Jones, K.C., 1993. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* amended with heavy metal contaminated sewage sludges. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 227-231.
- Ohwada, T., Shirakawa, Y., Kusumoto, M., Masuda, H., Sato, T., 1999. Susceptibility to hydrogen peroxide and catalase activity of root nodule bacteria. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 63, 457-462.
- Oldroyd, G.E.D., Downie, J.A., 2004. Calcium, kinases and nodulation signaling in legumes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 566-576.
- Oliveira, A., Pampulha, M.E., 2006. Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102, 157-161.
- Okogun, J.A., Sanginga, N., 2003. Can introduced and indigenous rhizobial strains compete for nodule formation by promiscuous soybean in the moist savanna agroecological zone of Nigeria?. *Biology and Fertility of Soils* 38, 26-31.
- Otte, M., Bestebroer, S., Van der Linden, J., Rozema, J., Broekman, R., 1991. A survey of zinc, copper, and cadmium concentrations in salt marsh plants along the Dutch Coast. *Environmental Pollution* 72, 175-189.
- Outten, F.W., Outten, C.E., O'Halloran, T.V., 2000. Metalloregulatory systems at the interface between bacterial metal homeostasis and resistance. In: Storz, G., Hengge-Aronis, R., (Eds.), *Bacterial Stress Response*. ASM Press, Washington, D.C, pp. 145-157.
- Oyaizu, H., Naruhashi, N., Gamou, T., 1992. Molecular methods of analyzing bacterial diversity: the case of rhizobia. *Biodiversity and Conservation* 1, 237-249.
- Pace, N.R., 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276, 734-740.
- Pacheco, C.C, Passos, J.F., Castro, A.R., Moradas-Ferreira, P., De Marco, P., 2008. Role of respiration and glutathione in cadmium-induced oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *Archives in Microbiology* 189, 271-278.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1987. Studies on the quantitative and qualitative characterization of glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory Medicine* 70, 158-165.
- Pant, H.K., Warman, P.R., 2000. Enzymatic hydrolysis of soil organic phosphorus by immobilized phosphatases. *Biology and Fertility of Soils* 30, 306-311.

- Parr, J.F., Papendick, R.I., 1997. Soil quality: relationship and strategies for sustainable dryland farming systems. *Annals of Arid Zone* 36, 181-191.
- Pathak, A., Dastidar, M.G., Sreekrishnan, T.R., 2009. Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: A review. *Journal of Environmental Management* 90, 2343-2353.
- Pathak, N., Khandelwal, S., 2006. Influence of cadmium on murine thymocytes: Potentiation of apoptosis and oxidative stress. *Toxicology Letters* 165, 121-132.
- Pascual, J.A., Garcia, C., Hernandez, T., Moreno, J.L., ROS, M., 2000. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation process. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1877-1883.
- Pavlicek, A., Hrdá, S., Flegr, J., 1999. Free-Tree—freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica* 45, 97-99.
- Peijnenburg, W., 2004. Fate of contaminants in soil. In: Doelman, P., Eijsackers, H.J.P., (Eds.), *Vital soil. Function, values and properties. Developments in soil science*. Elsevier, Amsterdam, pp. 245-280.
- Peoples, M.B., Craswell, E.T., 1992. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil* 141, 13-39.
- Pereira, S.I.A., Lima, A.I.G., Figueira, E.M.A.P., 2006a. Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* isolated from soils subjected to different sources of heavy-metal contamination: effects on protein expression. *Applied Soil Ecology* 33, 286-293.
- Pereira, S.I.A., Lima, A.I.G., Figueira, E.M.A.P., 2006b. Screening possible mechanisms mediating cadmium resistance in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from contaminated Portuguese soils. *Microbial Ecology* 52, 176-186.
- Pereira, R., Sousa, J.P., Ribeiro, R., Gonçalves, F., 2006c. Microbial indicators in mine soils (S. Domingos Mine, Portugal). *Soil Biology and Biochemistry* 15, 147-167.
- Peters, J.W., Fisher, K., Dean, D.R., 1995. Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annual Review of Microbiology* 49, 335-366.
- Pick, E., Mizel, D., 1981. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *Journal of Immunological Methods* 46, 211-226.
- Prévéral, S., Gayet, L., Moldes, C., Hoffmann, J., Mounicou, S., Gruet, A., Reynaud, F., Lobinski, R., Verbavatz, J., Vavasseur, A., Forestier, C., 2009. A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans. Heavy metal tolerance conferred by the ATP-binding cassette (ABC) transporter SpHMT1 requires glutathione but not metal-chelating phytochelatin peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 4936-4943.

- Primavesi, A., 1984. Manejo ecológico del suelo. La agricultura en regiones tropicales. 5ª Edición. El Ateneo. Rio de Janeiro, Brazil, pp. 499.
- Purchase, D., Miles, R.J., Young, T.W.K., 1997. Cadmium uptake and nitrogen fixing ability in heavy-metal-resistant laboratory and field strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. FEMS Microbiology Ecology 22, 85-93.
- Quintino, V., Rodrigues, A.M., Gentil, F., 1989. Assessment of macrozoobenthic communities in the lagoon of Óbidos, western coast of Portugal. Scientia Marina 53, 645-654.
- Rademaker, J.L.W., Louws, F.J., de Bruijn, F.J., 1998. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., de Bruijn, F.J., (Eds.), Molecular Microbial Ecology Manual, supplement 3, Kluwer, pp. 1-26.
- Rasmussen, L.D., Sorensen, S.J., 1998. The effect of long term exposure to mercury on the bacterial community in marine sediment. Current Microbiology 36, 291-297.
- Reber, H.H., 1992 Simultaneous estimates of the diversity and degradative capability of heavy metal affected soil bacterial communities. Biology and Fertility of Soil 13, 181-186.
- Reddy, G.B., Cheng, C.N., Dunn, S.J., 1983. Survival of *Rhizobium japonicum* in soil-sludge environment. Soil Biology and Biochemistry 15, 343-345.
- Rehman, A., Nautiyal, C.S., 2002. Effect of drought on the growth and survival of the stress-tolerant bacterium *Rhizobium* sp. NBRI2505 *sesbania* and its drought-sensitive transposon Tn5 mutant. Current Microbiology 45, 368-377.
- Rensing, C., Sun, Y., Mistra, B., Rosen, B.P., 1998. Pb(II) translocating p-type ATPases. Journal Biology Biochemistry 273, 32614-32617.
- Rice, C.W., 2002. Organic matter and nutrient dynamics. In: Encyclopedia of soil science, Marcel Dekker Inc, New York, USA, pp. 925-928.
- Richardson, A.E., Simpson, R.J., 1988. Enumeration and distribution of *Rhizobium trifolii* under a subterranean clover-based pasture growing in an acid soil. Soil Biology and Biochemistry 20, 431-438.
- Roane, T.M., 1999. Lead resistance in two isolates from heavy metal-contaminated soils. Microbiol Ecology 37, 218-224.
- Roane, T., Pepper, I., 2000. Microorganisms and metal pollutants. In: Maier, R.M., Pepper, I., Gerba, C.P., (Eds.), Environmental Microbiology, Academic Press, New York, pp. 403-423.

- Robinson, B., Russell, C., Hedley, M., Clothier, B., 2001. Cadmium adsorption by rhizobacteria: implications for New Zealand pastureland. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 87, 315-321.
- Rocha, F., Almeida, F.E., Gomes, C., 1996. Argilização em filões mineralizados com Pb e Ag das minas do Braçal: aspectos mineralógicos e geoquímicos. *Geociências. Revista Universidade Aveiro* 10, 25-30.
- Roth, E., Jeon, K., Stacey, G., 1988. Homology in endosymbiotic systems: the term "symbiosome". In: Palacios, R., Verma, D.P.S., (Eds.), *Molecular genetics of plant microbe interactions*. American Phytopathology Society Press, St. Paul, pp. 220-225.
- Rother, J.A., Millbank, J. ., Thornton, I., 1983. Nitrogen fixation by white clover (*Trifolium repens*) in grasslands on soils contaminated with Cd, Pb, and Zn, *Soil Science* 34, 127-136.
- Rossbach, S.R., Rasul, G., Schneider, M., Eardley, B., de Bruijn, F.J., 1995. Structural and functional conservation of the rhizopine catabolism (*moc*) locus is limited to selected *Rhizobium meliloti* strains and unrelated to their geographical origin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8, 549-559 .
- Rossel, D., Tarradellas, J., 1991. Dehydrogenase activity of soil microflora: significance in ecotoxicological tests. *Environmental Toxicology Water Quality* 6, 17-33.
- Saldaña, G., Martinez-Alcantara, V., Vinardell, J.M., Bellogin, R., Ruiz-Sainz, J.E., Balatti, P.A., 2003. Genetic diversity of fast-growing rhizobia that nodulate soybean (*Glycine max* L. Merr). *Archives of Microbiology* 180, 45-52.
- Sandaa, R.A., Enger, Ø., Torsvik, V., 1999 Abundance and Diversity of *Archaea* in Heavy-Metal-Contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 3293-3297.
- Sandaa, R.A., Torsvik, V., Enger, Ø., 2001. Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 287-295.
- Sanders, J.R., McGrath, S.P., Adams, T.M., 1986. Zinc, copper and nickel concentrations in ryegrass grown on sludge-contaminated soils of different pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37, 961-968.
- Sanità di Toppi, L., Gabrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41, 105-130.
- Santos, R., Bocquet, S., Puppo, A., Touati, D., 1999. Characterization of an atypical superoxide dismutase from *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 181, 4509-4516.
- Santos, R., Hérouart, D., Puppo, A., Touati, D., 2000. Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Molecular Microbiology* 38, 750-759.

- Santos, R., Hérouart, D., Sigaud, S., Touati, D., Puppo, A., 2001. Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 14, 86-89.
- Saravanakumar, D., Vijayakumar, C., Kumar, N., Samiyappan, R., 2008. PGPR-induced defense responses in the tea plant against blister disease. *Crop Protection* 26, 556-565.
- Sawada, H., Kuykendall, L.D., Young, J.M., 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *Journal of General and Applied Microbiology* 49, 155-179.
- Scher, F.M., Baker, R., 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* with pathogens. *Phytopathology* 72, 1567-1573.
- Scott, J.A., Palmer, S.J., 1990. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. *Applied Environmental Microbiology* 33, 221-225.
- Selenska-Pobell, S., Gigova, L., Petrova, N., 1995. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primers. *The Journal of Applied Bacteriology* 79, 425-431.
- Shamseldin, A.A.Y., Vinuesa, P., Thierfelder, H., Werner, D., 2005. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate *Phaseolus vulgaris* in Egyptian soils and display cultivar-dependent symbiotic efficiency. *Symbiosis* 38, 145-161.
- Shanahan, P., O'Sullivan, D.J., Simpson, P., Glennon, J.D., O'Gara, F., 1992. Isolation of 2,4-diacetylphlorogucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 353-358.
- Sharma, R.S., Mohammed, A., Mishr, V., Babu, C.R., 2005. Diversity in a promiscuous group of rhizobia from three *Sesbania* spp. colonizing ecologically distinct habitats of the semi-arid Delhi region. *Research in Microbiology* 156, 57-67.
- Shen, G., Lu, Y., Hong, J., 2005. Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzyme. *Chemosphere* 61, 1175-1182.
- Sigaud, S., Becquet, V., Frendo, P., Puppo, A., Hérouart, D., 1999. Differential regulation of two divergent *Sinorhizobium meliloti* genes for HPII-like catalases during free-living growth and protective role of both catalases during symbiosis. *Journal of Bacteriology* 181, 2634-2639.
- Sikora, S., Redžepović, S., 2003. Genotypic characterization of indigenous soybean rhizobia by PCR-RFLP of 16S rDNA, rep-PCR, rep-PCR and RAPD analysis. *Food Technology and Biotechnology* 41, 61-67.
- Silver, S., 1992. Plasmid-determined metal resistance mechanisms. Range and overview. *Plasmid* 27, 1-3.

- Silver, S., Ji, G., 1994. Newer systems for bacterial resistances to toxic heavy metals. *Environmental Health Perspective* 102, 107-113.
- Silver, S., Misra, T.K., 1988. Plasmid-mediated heavy metal resistances. *Annual Reviews of Microbiology* 42, 717-743.
- Silver, S., Phung, L.T., 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Reviews of Microbiology* 50, 753-789.
- Singh, R.P., Agrawal, M., 2008 Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Management* 28, 347-358.
- Siverio, F., Cambra, M., Gorris, M.T., Corzo, J., López, M.M., 1993. Lipopolysaccharides as determinants of serological variability in *Pseudomonas corrugata*. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1805-1812.
- Smith, S.R., 1992. Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 485-492.
- Smith, S.R., Giller, K.E., 1992. Effective *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* present in five soils contaminated with heavy metals from long-term applications of sewage sludge or metal mine spoil. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 781-788.
- Smolders, E., Oorts, K., Van Sprang, P., Schoeters, I., Janssen, C.R., McGrath, S.P., McLaughlin, M.J., 2009. Toxicity of trace metals in soil as affected by soil type and ageing after contamination: using calibrated bioavailability models to set ecological soil standards. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 1633-1642.
- Sobecky, P.A., Mincer, T.J., Chang, M.C., Helinski, D.R., 1997. Plasmids isolated from marine sediment microbial communities contain replication and incompatibility regions unrelated to those of known plasmid groups. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 888-895.
- Sobolev, D., Begonia, M.F.T., 2008. Effects of Heavy Metal Contamination upon Soil Microbes: Lead-induced Changes in General and Denitrifying Microbial Communities as Evidenced by Molecular Markers. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 5, 450-456.
- Somasegaran, P., Hoben, H.J., 1994. *Handbook for Rhizobia*. Springer-Verlag, Berlin.
- Stadman, E.R., 1990. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radial Biology Medicine* 9, 315-325.
- Stephens, J.H.G., Rask, H.M., 2000. Inoculant production and formulation. *Field Crops Research* 65, 249-258.

- Stępniewska, Z., Wolińska, A., Ziomek, J., 2009. Response of soil catalase activity to chromium contamination. *Journal of Environmental Sciences* 21, 1142-1147.
- Stevenson, F.J., 1994. *Humus Chemistry: Genesis, composition, reactions*. John Wiley & Sons, New York.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 321-336.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchi, M., 2001. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *Journal of Environmental Pathology Toxicology Oncology* 20, 77-88.
- Stoppel, R D., Meyer, M., Schlegel G.H., 1995. The nickel resistance determinant cloned from the enterobacterium *Klebsiella oxytoca*: conjugational transfer, expression, regulation and DNA homologies to various nickel-resistant bacteria. *BioMetals* 8, 70-79.
- Storz, G., Imlay, J.A., 1999. Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology* 2, 188-94.
- Stowers, M.D., Elkan, G.H., 1981. An inducible iron-containing superoxide dismutase in *Rhizobium japonicum*. *Canadian Journal of Microbiology* 27, 1202-1208.
- Strufii, P., Corich, V., Giacomini, A., Benguedouar, A., Squartini, A., Casella, S., Nuti, M.P., 1998. Metabolic properties, stress tolerance and macromolecular profiles of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium*. *Journal of Applied Microbiology* 84, 81-89.
- Sundquist, A.R., Fahey, R.C., 1989. Evolution of antioxidant mechanisms: thiol-dependent peroxidases and thioltransferase among prokaryotes. *Journal of Molecular Evolution* 29, 429-35.
- Sutherland, I.W., 1985. Biosynthesis and composition of Gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annual Review of Microbiology* 39, 243-270.
- Tabatabai, M.A., 1994. Soil enzymes. In: Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomly, P.S., (Eds.), *Methods of Soil Analyses, Part 2, Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America, USA, pp. 775-833.
- Tamaki, S., Frankenberger, J.W.T., 1992. Environmental biogeochemistry of arsenic. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 124, 79-110.
- Tan, Z., Hurek, T., Vinuesa, P., Muller, P., Ladha, J.K., Reinhold-Hurek, B., 2001. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3655-3664.
- Tao, H., Brewin, N.J., Noel, K.D., 1992. *Rhizobium leguminosarum* CFN42 lipopolysaccharide antigenic changes induced by environmental conditions. *Journal of Bacteriology* 174, 2222-2229.

- Top, E.M., Maila, M.P., Clerinx, M., Goris, J., De Vos, P., Verstraete, W., 1999. Methane oxidation as method to evaluate the removal of 2,4-D from soil by plasmid-mediated bioaugmentation. *FEMS Microbiology Ecology* 28, 203-213.
- Toro, N., Olivares, J., 1986. Analysis of *Rhizobium meliloti* Sym mutants obtained by heat-treatment. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 1148-1150.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F.L., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 782-787.
- Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.A., Ovreas, L., 1998. Review article: novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* 64, 53-62.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S., Gil-Sotres, F., 2000. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1867-1875.
- Trevors, J.T., Stratton, G.W., Gadd, G.M., 1986. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 32, 447- 464.
- Trevors, J.T., 1998. Molecular evolution in bacteria: cell division. *Revista de Microbiologia* 29, 237-245.
- Tsai, C.M., Frash, C.E., 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 119, 115-119.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., Matsuguchi, T., 1995. Phylogeny of Sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a *nodC* segment. *Journal of Bacteriology* 177, 468-472.
- United Nations, 2004. World Population to 2300. United Nations Population Division, New York.
- Valery, B., Eugene, K., 1998. Soil surface geochemical anomaly around the copper–nickel metallurgical smelter. *Water, Air and Soil Pollution* 103, 197-218.
- Valls, M., de Lorenzo, V., 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 327-338.
- Valverde, C., Hozbor, D.F., Lagares, A., 1997. Rapid preparation of affinity-purified lipopolysaccharide samples for electrophoretic analysis. *Biotechniques* 22, 230-236.
- van Berkum, P., Navarro, R.B., Vargas, A.A.T., 1994. Classification of the uptake hydrogenase-positive (*Hup*⁺) bean rhizobia as *Rhizobium tropici*. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 554-561.
- van Gestel, C.A.M., 2008. Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soils. *Science of the Total Environment*. 406, 385-395.

- van Rhijn, P., Vanderleylen, J., 1995. The *Rhizobium*-Plant symbiosis. *Microbiology Reviews* 59, 124-142.
- van Straalen, N.M., 2002. Assessment of soil contamination – a functional perspectives. *Biodegradation* 13, 41-52.
- Varenes, A., 2003. Produtividade dos solos e ambiente. Escolar Editora, Lisboa, Portugal.
- Varillas, J.C., Hernández, J.H., Navarro, A.G., 2006. Polisacáridos y lopolisacáridos rizobianos. Estructura y papel en la simbiosis. In: Bedmar, E.J., González, J., Lunch, C., Rodelas, B., (Eds.), Fijación de Nitrógeno. Fundamentos y Aplicaciones. Sociedade Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), pp. 148-159.
- Vega, F.A., Covelo, E.F., Andrade, M.L., Marcet, P., 2004. Relationships between heavy metals content and soil properties in minesoils. *Analytica Chimica Acta* 524, 141-150.
- Velagaleti, R.R., Cline, G.R., 1995. Biological nitrogen fixation in legumes and nitrogen transfer in crop plants. In: Pessarakly, M., (Ed.), *Handbook of plant and crop physiology*. Marcel Decker, New York, pp. 303-335.
- Velázquez, E., Mateos, P.F., Pedrero, P., Dazzo F.B., Martínez-Molina, E., 1995. Attenuation of symbiotic effectiveness by *Rhizobium meliloti* SAF22 related to the presence of a cryptic plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2033-2036.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., Lupski, J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 25-40.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R., 2001. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genome, *Nucleic Acid Research* 19, 6823-6831.
- Versaw, W.K., Harrison, M.J., 2002. A chloroplast phosphate transporter, PHT2; Influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell* 14, 1751-1766.
- Vessey, J.K., Chemining'wa, G.N., 2006. The genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in cultivated soils of the eastern Canadian prairie. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 153-163.
- Villarreal, A.W., Caballero, J., 2010. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating Burkholderia species based on PCR 16SrRNA species-specific oligonucleotides. *Systematic and Applied Microbiology* 33, 35-43.
- Vincent, J.M.A., 1970. Manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- Vinuesa, P., Rademaker, J.L.W., de Bruijn, F.J., Werner, D., 1998. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2096-2104.
- Visser, S., Parkinson, D., 1992. Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture* 7, 33-37.
- Vogelstein, B., Gillespie, D., 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 615-619.
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95-117.
- Wani, P.A., Khan, M.S., Zhaid, A., 2007a. Chromium reduction, plant growth-promoting potentials and metal solubilisation by *Bacillus* sp. Isolated from alluvial soil. *Current Microbiology* 54, 237-243.
- Wani, P.A., Khan, M.S., Zhaid, A., 2007b. Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram plants. *Chemosphere* 70, 36-45.
- Weaver, R.W., Wei, G.R., Berryhill, D.L., 1990. Stability of plasmids in *Rhizobium phaseoli* during culture. *Soil Biology and Biochemistry* 22, 465-469.
- Webb, J.S., 1958. Observations on the geology and origin of the San Domingos pyrite deposit, Portugal. *Comunicações dos Serviços Geológicos de Portugal, Separata do tomo XLII, Lisboa, Portugal*, pp. 129-142.
- Welp, G., 1999. Inhibitory effects of the total and water-soluble concentrations of nine different metals on the dehydrogenase activity of a loess soil. *Biology and Fertility of Soils*. 30, 132-139.
- Wheeler, C.R., Salzman, J.A., Elsayed, N.M., 1990. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry* 184, 193-199.
- White, P.J., 2001. Phytoremediation assisted by microbes. *Trends in Plant Science* 6, 502.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schravdner, M., Langebartels, C., Van Montagu, C., Inzé, D., Van Camp, W., 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress in C₃ plants, *EMBO Journal* 16, 4806-4816.
- Wilson, D.O., Reisenauer, H.M., 1970. Effect of manganese and zinc ions on the growth of *Rhizobium*. *Journal of Bacteriology* 103, 729-732.

- Wood, N.J., Sørensen, J., 2001. Catalase and superoxide dismutase activity in ammonium-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 38, 53-58.
- Wyszkowska, J., 2002. Soil contamination by chromium and its enzymatic activity and yielding. *Polish Journal of Environmental Studies*, 11, 79-84.
- Xu, D., Chen, B., Liu, W., Liu, G., Liu, W., 2007. Effects of Hg and Cu on the activities of soil acid phosphatase. *Journal of Zhejiang University Science A* 8, 1157-1163.
- Yakovchenko, V.I., Sikora, L.J., Rauffman, D.D., 1996. A biologically based indicator of soil quality. *Biology and Fertility of Soils* 21, 245-252.
- Yamaoka-Yano, D.M., Valarini, P.J., 1998. Métodos de identificação de Bactérias. In: Melo, I.S., Azevedo, J.L., (Eds.), *Ecologia Microbiana*. EMBRAPA - CNPMA, Jaguariúna, pp. 369-419.
- Yanni, Y.G., Rizk, R.Y., Corich, V., Squartini, A., Dazzo, F.B., 1995. Endorhizosphere colonization and growth promotion of *Indica* and *Japonicana* rice varieties by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. In: Proc 15th North American Symbiotic Nitrogen-Fixation Conference. North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Youn, H.D., Kim, E.J., J.H. Roe, J.H., Hah, Y.C., Kang, S.O., 1996. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochemistry Journal* 318, 889-896.
- Young, J.M., 2003. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen *et al.* 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang *et al.* 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems *et al.* 2003 legitimate? Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 2107-2110.
- Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H., 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 89-103.
- Young, J.P.W., 1994. Sex and the single cell: The population ecology and genetics of microbes. In: Ritz, K., Dighton, J., Giller, K.E., (Eds.), *Beyond the biomass. Compositional and functional analysis of soil microbial communities*. John Wiley, Chichester, pp. 101-107.
- Young, J.P.W., Downer, H.L., Eardly, B.D., 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *Journal of Bacteriology* 17, 2271-227.
- Zahran, H.H., 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 63, 968-989.

Zdruli, P., Jones, R.J.A., Montanarella, L., 2004. Organic Matter in the Soils of Southern Europe. European Soil Bureau Technical Report, EUR 21083 EN. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

Zeller, T., Klug, G., 2006. Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften* 93, 259-66.

Zhang, X.X., Kosier, B., Priefer, U.B., 2001. Symbiotic Plasmid Rearrangement in *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae VF39SM. *Journal of Bacteriology* 183, 2141-2144.

Zhender, G.W., Yao, C., Murphy, J.F., Sikora, E.R., Kloepper, J.W., Schuster, D.J., Polston, J.E., 1999. Microbe-induced resistance against pathogens and herbivores: evidence of effectiveness in agriculture. In: Agarwal, A.A., Tuzun, S., Bent, E., (Eds.), *Induced plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology and agriculture*. APS Press, St Paul, pp. 33.

Zhou, Z.S., Wang, S.J., Yang, Z.M., 2008 Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere* 70, 1500-1509.

Zou, X., Feng, X.L., Chen, W.X., Li, F.D., 1998. Biological behavior of plasmid in *Rhizobium* sp. strain S25 from *Tephrosia candida* Xianghong. *Plasmid* 40, 158-163.

Zurkowski, W., 1982. Molecular mechanism for loss of nodulation properties of *Rhizobium trifolii*. *Journal of Bacteriology* 150, 999-1007.